

HPV *In situ* -hybridisaation käyttöönotto

Kätilöopiston sairaalan patologian laboratoriossa

Bioanalytiikan koulutusohjelma,
bioanalyttikko
Opinnäytetyö
16.4.2007

Päivi Burakoff
Marjo Saloranta
Sara Suominen

Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Päivi Burakoff, Marjo Saloranta ja Sara Suominen			
Työn nimi			
HPV In situ -hybridisaation käyttöönotto Kätilöopiston sairaalan patologian laboratoriossa			
Työn laji		Aika	Sivumäärä
Opinnäytetyö		Kevät 2007	42+7 liitettä
TIIVISTELMÄ			
<p>Ihmisen papilloomavirus (Human papillomavirus HPV) aiheuttaa yleisen sukupuoliteitse leviävän tartuntataudin. Virusinfektiolla on todettu olevan yhteys kohdunkaulan syöpään ja on siksi tärkeä tutkimuskohde. Kätilöopiston sairaalan patologian laboratoriossa tutkitaan HPV:ta Hybrid Capture 2 -menetelmällä, joka antaa tuloksen kvantitatiivisena. Tulos on joko positiivinen tai negatiivinen korkean riskin HPV-genotyypeille.</p> <p>Tutkimuskohteena oli ihmisen papilloomavirusta määrittävä in situ -hybridisaatiomenetelmä, joka on tarkoitus ottaa käyttöön Kätilöopiston sairaalan patologian laboratorioon.</p> <p>Näyttemateriaali kerättiin HUSLAB:n Qpati-tietokannasta. 40 potilastapausta valittiin, joista kymmenen potilastapausta kuuluu kondyloma planum-, kymmenen dysplasia levis-, kymmenen dysplasia moderata- ja viimeiset kymmenen dysplasia gravis -luokitukseen. Näytteet oli valettu parafiiniin, joista leikkattiin uudet näytelasit. Näistä tehtiin HPV in situ -hybridisaatio-, p16INK4a-, Ki67- ja hematoksyliini-eosiinivärjäykset. HPV ISH:n tuloksia verrattiin negatiivisten ja positiivisten kontrollien antamiin tuloksiin. Lisäksi tutkittiin proteiinien p16INK4a ja Ki67 vastaavuutta HPV ISH:n antamiin tuloksiin. Ki67 ja p16INK4a ovat merkkiaineita, joita havaitaan HPV:n aiheuttamissa dysplastisissa muutoksissa. HE-värjäyksen avulla tarkistettiin diagnoosiluokat.</p> <p>HPV in situ -hybridisaationäytteissä esiintyi HPV DNA-viruskopioita 82,5 %:ssa (33/40). Näytteistä negatiivisen tuloksen antoi 12,5 % (5/40) ja 5 % (2/40) niistä ei voitu tulkita. Immunohistokemialliset värjäykset antoivat keskenään yhteneväisiä tuloksia. Tulokset olivat yhteneviä myös HPV in situ -hybridisaation antamiin tuloksiin. Tulokset olivat luotettavia, koska negatiivinen kontrolli antoi negatiivisen ja positiivinen kontrolli positiivisen tuloksen. Hematoksyliini-eosiinivärjäyksellä tarkistetuista diagnoosiluokista 20 prosenttia (8/40) oli muuttunut.</p> <p>Tulokset olivat luotettavia, joten voidaan todeta, että in situ -hybridisaatiomenetelmä voidaan ottaa käyttöön Kätilöopiston sairaalan patologian laboratoriolle.</p>			
Avainsanat			
in situ -hybridisaatio, p16INK4a, Ki67, ihmisen papillomavirus, HPV, ISH.			

Degree Programme in		Degree
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care Services
Author/Authors		
Päivi Burakoff, Marjo Saloranta and Sara Suominen		
Title		
Testing New Method, HPV in situ -Hybridization for Pathology Department of Kätilöopisto Hospital		
Type of Work	Date	Pages
Final Project	Spring 2007	42+7 appendices
<p>ABSTRACT</p> <p>Human papillomavirus cause a general disease which is spread by a genital contact. Human papillomavirus is an important object of research because it has been discovered that cervical cancer is related to HPV. In Pathology Department of Kätilöopisto Hospital HPV is analysed by using a Hybrid Capture 2 -test which gives a quantitative result. The result is either positive or negative for high-risk types of HPV.</p> <p>The aim of the research was in situ -hybridization which defines Human Papillomavirus from a tissue sample. The purpose was to test that method for the Pathology Department of Kätilöopisto Hospital.</p> <p>The samples were collected from the HUSLAB's data bank of Qpati. Fourty (40) cases were chosen including four different diagnostic classifications, ten cases of each. Those diagnostic classifications are condyloma planum-, dysplasia levis-, dysplasia moderata- and dysplasia gravis. The smears had been already prepared from paraffin-embedded diagnostic biopsies and surgical materials. The work started by cutting the samples onto the slides. Four different stains were performed, HPV in situ -hybridization, p16, Ki67 and Hematoxylin and eosin stains from each diagnostic classification. The results of HPV in situ -hybridization were compared to positive and negative controls. Apart from that the correlation of p16-, Ki67 markers to HPV ISH were researched. Expression status of p16INK4a and Ki67 is associated with dysplastic changes of HPV. Diagnostic classifications were checked by means of Hematoxylin and eosin stains.</p> <p>In HPV in situ -hybridization samples HPV DNA virus copies were found in 87,5%. (33/40). Of the samples 12,5% (5/40) gave negative results and 5% (2/40) of the samples would not be to construed. The samples of immunohistochemistry, p16 and Ki67, gave together congruent results. The results were also congruent with HPV in situ hybridization. The results were reliable because of the controls. The negative controls gave negative and positive controls gave positive results. Twenty (20%) per cent of diagnostic classifications were changed on the basis of Hematoxylin and eosin stains.</p> <p>The results were reliable. Because the research was successful the Pathology Department of Kätilöopisto Hospital can use HPV in situ -hybridization in future.</p>		
Keywords		
In situ -hybridization, p16INK4a, Ki67, Human papillomavirus, HPV,ISH.		

1. JOHDANTO	1
2. IHMISEN PAPILLOOMAVIRUKSEN GENOMI JA SEN TRANSFORMAATIO	3
3. IHMISEN PAPILLOOMAVIRUKSEN ESIASTEET JA NIIDEN LUOKITTELU	4
3.1. Ihmisen papilloomavirus -infektiossa näkyvät solumuutokset	5
3.1.1. Sytologinen luokitus	5
3.1.1. Histologinen luokitus	6
4. IHMISEN PAPILLOOMAVIRUKSEN TUTKIMUSMENETELMÄT	8
4.1. <i>In situ</i> -hybridisaatio (ISH)	8
4.2. Kromogeeninen <i>in situ</i> -hybridisaatio (CISH)	9
4.2.1 Esikäsittely eli entsyymidigestio	10
4.2.1. Denaturaatio	10
4.2.2. Hybridisaatio	11
4.2.3. Pesut	11
4.2.4. Detektio eli hybridin näkyväksi saattaminen	11
4.3. Muut tutkimukseen liittyvät menetelmät	12
4.3.1. Hybrid Capture 2 (HC2)	12
4.3.1. Immunihistokemialliset (IHC) menetelmät	13
4.3.2. p16INK4a menetelmän periaate	15
4.3.3. Ki67 menetelmän periaate	16
4.3.4. Hematoksyliini-eosiinivärjäyksen periaate	17
5. AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET	17
6. TUTKIMUSONGELMAT	19
7. TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN	20
7.1. Näytteiden keräys	20
7.2. Näytteiden leikkaaminen	21
7.3. Näytteiden värjäys	22
7.3.1. <i>In situ</i> -hybridisaatio	22
7.3.2. Immunohistokemialliset värjäykset p16INK4a ja KI67	24
7.3.3. Hematoksyliini-eosiinivärjäys	24
7.4. Näytteiden mikroskopointi	24
7.5. Värjäyksien kriteerien määrittäminen	25
7.6. Tuloksien kirjaaminen	29

8.	TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA	30
8.1.	Dysplastisten luokitusten vertailu	31
8.2.	<i>In situ</i> -hybridisaation antamat tulokset	32
8.3.	Muiden merkkiaineiden (p16INK4a ja Ki67) vastaavuus HPV <i>In situ</i> -hybridisaation antamiin tuloksiin	33
8.4.	Kontrollien antamat tulokset	34
8.5.	Tulosten yhteenveto	34
9.	LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI	34
10.	POHDINTA	37
11.	LÄHTEET	
12.	LIITTEET 1-7	

1 JOHDANTO

Ihmisen papilloomavirus (*Human papillomavirus eli HPV*) -infektio on yleisin sukupuoliteitse leviävä tartuntatauti. Se on arviolta 4-5 kertaa klamydiatartuntaa yleisempi. Suomessa tehtyjen tutkimusten mukaan kahdeksan ihmistä kymmenestä on saanut ihmisen papilloomavirustartunnan elämänsä aikana. Infektio voi olla täysin oireeton ja tästä syystä tartunnan saanut voi olla tietämätön siitä. Itämis aika tartunnasta muutoksiin voi kestää pitkään. Niiden ilmaantuminen vie vähintään useita viikkoja, tyypillisimmillään 3-4 kuukautta ja joskus jopa vuosia. Ihmisen papilloomavirukset ovat spesifisiä infektoituvan kudoksen suhteen, virukset infektoivat ainoastaan ihon ja limakalvojen epiteelisoluja. Toistaiseksi ei ole kyetty kehittämään parantavaa lääkitystä, tosin virus häviää useimmiten ajan kanssa itsestään. (Polvi 2006; Huovinen ym. 2005: 591.)

Tutkijat ovat todenneet kohdunkaulan syövän ja ihmisen papilloomaviruksen välisen yhteyden. Kohdunkaulansyövän keskeisin ja tärkein taustatekijä on ihmisen papilloomavirus. (Käypähoito 2006 a.) Ihmisen papilloomavirus aiheuttaa valtaosan kohdunkaulansyövästä ja sen esiasteista. Ihmisen papilloomavirusten onkogeeninen merkitsevyys ja syöpäyhteys on osoitettu sekä in vitro että epidemiologisesti. (Polvi 2006; Huovinen ym. 2005: 591.) Useat väestötutkimuksetkin tukevat ihmisen papilloomavirusinfektion ja kohdunkaulansyövän välistä yhteyttä (Käypähoito 2006 a).

Pitkittyvä virustulehdus saa aikaan solumuutoksia. Pieni osa etenee esiasteiksi ja edelleen syöväksi. Koska syöpä on monitekijäinen sairaus, vaikuttavat sen syntyyn toki monet muutkin tekijät. Altistavat tekijät ovat esimerkiksi ympäristöperäisiä tai liittyvät ihmisen elintapoihin ja vastustuskykyyn. Myös yhdyntöjen varhainen alkamisikä, partnereiden runsaus, tupakointi, HIV-infektio ja immuunipuolustusta heikentävä lääkitys voivat lisätä riskiä. (Turun yliopisto 2007; Käypähoito 2006 a.)

Suomessa kohdunkaulansyöpää ehkäisevään seulontaan eli joukkotarkastukseen kutsutaan viiden vuoden välein kaikki 30-, 35-, 40-, 45-, 50-, 55- ja 60-vuotiaat naiset. Joissakin kunnissa kutsun saavat myös 25- ja/tai 65-vuotiaat. Helsingin ja Uudenmaan alueelta tulee Kätilöopiston sairaalaan noin 70 000 gynekologista irtosolututkimusta vuodessa, joista 36 000 on joukkoseulonnana näytteitä. (Syöpäjärjestöt 2007.)

Helsingin ja Uudenmaan joukkoseulonnoissa on käytössä tällä hetkellä kolme erilaista tutkimusprojektia. On niin sanottu perinteinen gynekologinen irtosolututkimuksen ryhmä, papnet- eli automaatioavusteinen gynekologinen irtosolututkimuksen ryhmä ja HPV DNA-ryhmä. HPV DNA-ryhmään kuuluu kaikista joukkoseulonnoissa otetuista näytteistä 1/3. Kyseisen tutkimuksen tarkoitus on osoittaa erikseen korkean riskin HPV-tyypit. HPV-diagnostiikka yhdessä irtosolusytologian kanssa mahdollistaa herkemmän ja varhaisemman diagnoosin, kun potilaalle ei ole vielä kehittynyt HPV-muutoksia ja sytologinen diagnoosi on epävarma. HPV DNA-tutkimuksen toteuttaa Syöpäjärjestö yhteistyössä Kättilöopiston sairaalan patologian laboratorion kanssa. HPV-ryhmään kuuluvilta otetaan gynekologinen irtosolulasi normaalisti, mutta sitä ei katsota ellei HPV DNA-testi (Hybrid Capture 2 eli HC2-testi) ole positiivinen tai potilaalla on esiintynyt vuoto-oireita. HPV DNA-testin ollessa positiivinen sekä irtosolulasilla ollessa solumuutoksia (LSIL, HSIL) tai kolmen positiivisen HC2-tuloksen jälkeen potilaat ohjataan kolposkopiaan. Mahdollisilta kudoksen muutosalueilta otetaan koepaloja, jotka tutkitaan histologisesti. (Huovinen ym. 2005: 593.)

Kättilöopiston sairaalan patologian laboratorio tarvitsee tutkimuksen, jonka avulla ihmisen papilloomaviruksia voisi tutkia morfologisesti tarkemmin. Työmme tarkoituksena on tutkia Ventana Medical Systemsin Benchmark-immunovärjäysautomaatilla voidaanko HPV *in situ* -hybridisaatiomenetelmä ottaa käyttöön. Menetelmä mahdollistaisi tarkemman ihmisen papilloomavirusten visuaalisen havaitsemisen kudoksessa kuin esimerkiksi HC2-testi. HPV *in situ* -hybridisaation ohella teemme tutkimuksessamme myös kaksi immunohistologista värjäystä p16INK4a ja Ki67 sekä hematoksyliini-eosiinivärjäyksen. Lisävärjäykset toimivat työssämme apuvälineinä *in situ* -hybridisaatiota tutkittaessa. Merkkiaineiden eli p16INK4a- ja Ki67-proteiinien esiintymisen tulisi vastata HPV ISH-tuloksia. Tarkoituksemme on selvittää HPV *in situ* -hybridisaatiomenetelmän toimivuus ja luotettavuus. Tästä voimme päätellä, voiko menetelmän ottaa käyttöön Kättilöopiston sairaalan patologian laboratoriossa.

Ennen empiirisen työskentelyn aloittamista kokoamme teoretietoa rajaavista asioista. Pohjustamme työtä käsittelemällä keskeisiä asioita, jotka liittyvät ihmisen papilloomavirukseen, kudostuutoksien luokitukseen sekä tutkimuksien periaatteisiin. Empiirisen tutkimuksen onnistuminen ja luotettavien tuloksien saaminen on olennainen osa tutkimustamme.

Tulokset ovat tärkeitä, koska ne määrävät HPV *in situ*-hybridisaation tulevaisuudesta edellä mainitussa laboratoriossa. Se on tärkeä osa tutkimusvalikoimaa ottaen huomioon ihmisen papilloomaviruksen aiheuttaman terveysriskin.

2 IHMISEN PAPILLOOMAVIRUKSEN GENOMI JA SEN TRANSFORMAATIO

Ihmisen papilloomavirusten genomi (*geeniperimä*) koostuu aikaisesta (E, *early*) ja myöhäisestä (L, *late*) geenialueesta sen mukaan, missä infektion vaiheessa geenit ilmentyvät. Viruksen onkogeeneit ovat E-proteiineja. Näistä keskeisiä ovat E6 ja E7, joiden koodittamat proteiinit häiritsevät kasvurajoitegeenien koodaamien proteiinien p53 ja Rb (*retinoplasto*) toimintaa ja edistävät epiteelisten kasvainten toimintaa. Genitaalialueen pahanlaatuisissa kasvaimissa viruksen genomi on tavallisesti integroitunut eli liittynyt isäntäsolun kromosomaaliseen DNA:han ja replikoituu (*kahdentuu*) sen osana. Syöpäriskiä aiheuttavilla HPV-tyypeillä on mahdollisuus muuttaa infektoimansa solut pahanlaatuiseksi muunmuassa estämällä edellä mainittujen kasvunrajoitegeenien normaali toiminta. (Auvinen - Vaheri 2004 a; Aatonen - Hiltunen-Back - Paavonen 2002; Lehtinen ym. 2002.)

Todennäköisesti vaurio, esimerkiksi haava, epiteelissä mahdollistaa viruksen pääsyn basaalikerroksen soluihin. Virusreseptoria ei tunneta tarkasti, mutta se ei ole solutyypispesifi, sillä *in vitro* -tuotetut viruskapsidit tarttuvat useisiin eri solutyyppeihin. Täten viruksen epiteelispesifisyys ei johdu siitä, että niiden reseptori olisi läsnä vain epiteelisoluissa, vaan spesifisyyteen vaikuttavat muut tekijät. Ihmisen papilloomavirukset infektoivat epiteelisoluja, jotka ovat epiteelin ainoa jakautuva solukerros. Lisääntymissykli alkaa epiteelin tyvisoluissa, joiden pintarakenteisiin virus kiinnittyy. Tyvisoluihin päässyt virus kulkeutuu tumaan ja sen DNA vapautuu. DNA:n luennan perusteella syntyy varhaisia proteiineja (*E-proteiineit*), jotka edelleen ohjaavat virus-DNA:n monistumista (E1) ja viruksen muiden geenien luentaa (E2). HPV:n muilla varhaisilla proteiineilla on monimuotoisia vuorovaikutuksia solun tukirangan (E4) ja solunjakautumisen kannalta keskeisten kasvutekijäreseptoreiden (E5) kanssa. Näiden lisäksi varhaiset proteiinit vuorovaikuttavat p53- ja Rb-kasvunrajoitegeenien luennan perusteella syntyvien proteiinien ja eri sytokiinin kanssa (E6 ja E7). (Auvinen b; Lehtinen 2002.)

Ihmisen papilloomavirukset voidaan jakaa niin sanottuun pienen (esimerkiksi HPV 6 ja 11) ja korkean riskin (esimerkiksi 16 ja 18) virustyyppisiin sen mukaan, miten vahva yhteys niillä on luonnollisiin pahanlaatuisiin kasvaimiin. Korkean riskin ihmisen papilloomavirukset, erityisesti paljon tutkitut virustyyppit HPV 16 ja 18, ovat selvästi yhteydessä syöpiin. E6- ja E7-proteiinit luovat suotuisat edellytykset DNA-replikaatiolle. Tällöin sellaisten solujen määrä lisääntyy, joissa viruksen replikaatio voi tapahtua. Korkean riskin ihmisen papilloomavirustyyppien E6-proteiinit tarttuvat p53-tuumorisuppressoriproteiiniin ja lisäävät sen hajottamista, jonka seurauksena tuumorisuppressorifunktio estyy. E7-proteiini on myös tumaan lokalisoituva onkoproteiini. Se sitoutuu useisiin soluproteiineihin, muun muassa pRb-tuumorisuppressoriproteiiniin, inaktivoi sen ja stimuloi solun S-faasiin siirtymistä. (Auvinen b.)

E6- ja E7-onkogeenien läsnäolo ja lisääntynyt tuotanto liitetään usein pahanlaatuisiin kasvainsoluihin. E6- ja E7-onkoproteiinien toiminnot riittävät immortalisoimaan soluja (solujen nopea lisääntyminen), mutta ne eivät saa yksin aikaan solutransformaatiota. E7-proteiini sitoutuu retinoblastoomageenin (pRb) koodittamaan kasvunrajoiteproteiiniin ja sen sukulaisproteiineihin. E6- ja E7-onkoproteiinit voivat immortalisoida soluja toisistaan riippumatta, mutta yhdessä ne tehostavat toistensa toimintaa. (Auvinen ym. 2004 a.)

Basaalisoluissa ja epiteelin alemmissa solukerroksissa viruksen DNA-genomi on rengasmainen episomaalinen plasmidi. On mahdollista, että jokainen virusgenomin kopio kahdentuu täsmälleen kerran solusykliä kohti. Kahdentuminen tapahtuu yleensä solusyklin S-faasin aikana ja todennäköisesti siirtyy tytärsoluihin solun jakautuessa. Viruksen genomin kahdentuminen soluissa mahdollistaa persistentin (*pysyvän*) ja latentin (*piilevä*) infektion olemassaolon. (Auvinen b.)

3 IHMISEN PAPILLOOMAVIRUKSEN ESIASTEET JA NIIDEN LUOKITTELU

Kohdunkaulan portiossa (*emättimen pohjukka*) sijaitsevan junktioalueen muuntumiskohtaa pidetään herkimpänä kohtana infektoitumiselle, koska tällä alueella levyepiteeli muuttuu lieriöepiteeliksi. Valtaosa syövän esiasteista saa alkunsa muuntumiskohdasta. Esiasteet näkyvät yleisimmin muuntumisalueella olevien epiteelisolujen tuma-atypiana ja lisääntyneenä

mitoottisena aktiivisuutena. (Koivuniemi 1994: 62.)

Ihmisen papilloomavirukset ovat spesifisiä infektoituvan kudoksen suhteen. Ne infektoivat vain ihon tai limakalvojen epiteelisoluja. Koska epiteelin alin solukerros eli basaalisolukerros on ainoa jakautuva epiteelisolukerros, ajatellaan, että virusinfektion on levitäkseen saatava alkunsa basaalisoluista. (Auvinen ym. 2004 a.)

3.1 Ihmisen papilloomavirus -infektiossa näkyvät solumuutokset

Koilosytoosi on tyypillinen ja helposti tunnistettava löydös HPV:n yhteydessä. Koilosyytin tuman ympärillä näkyy niin sanottu kirkastuma eli halo ja tumia on normaalisti enemmän kuin yksi. Koilosyyttien tuma voi olla suurentunut ja/tai sen värjäytyminen on muuttunut. Tavallisesti löydös on keskikerroksen soluissa, mutta koilosytoosia voi esiintyä myös pintakerroksen soluissa. Syvimpien kerroksien soluissa esiintyy vain ihmisen papilloomaviruksen DNA:ta, ilman rakenneproteiinien ilmentämistä. Tästä syystä syvempien kerroksien solut eivät muutu koilosyyteiksi, eikä niissä tavata virusantigeenia eli rakenneproteiineja immunohistokemiallisten värjäyksien yhteydessä. HPV *in situ*-hybridisaatiota tarvitaan, koska immunohistokemialliset värjäykset eivät ilmennä ihmisen papilloomaviruksen DNA-viruskopioita. (Koivuniemi 1994: 70.)

HPV-infektion muuntuessa syövän esiasteiksi ja niiden kautta syöväksi, alkaa koilosyyttien määrä olla hyvin pieni ellei olematon. Epiteelistä, josta koilosyytit puuttuvat kokonaan, voidaan ilmentää HPV:n DNA:ta *in situ* -hybridisaatiota hyödyntämällä. (Koivuniemi 1994: 71.)

3.2 Sytologinen luokitus

Bethesda-luokitus on syrjäyttämässä perinteisen Papa-Nicolaoun luokituksen. Siinä otetaan huomioon näytteen laatu sekä luokitellaan muutoksen luonne, josta annetaan sanallinen kuvaus.

TAULUKKO1. Histologisten ja sytologisten löydösten suuntaa antava luokitus. (Käypähoito 2006 b.)

<u>Histologia</u>	<u>Sytologia</u>	<u>HPV-kategoria</u>
Kondyloma Planum	ASC-US/LSIL II	Pieniriski
CIN1	ASC-US/LSIL III/II	Pieni ja suuri riski
CIN2	HSIL(ASC-H) III	Suuri riski
CIN3	HSIL(ASC-H) III/IV	Suuri riski
Karsinooma	Karsinooma V	Suuri riski

ASC-US (*atypical squamous cells of undetermined significance*) on muutos, joka ei ole reaktiivinen eikä infektiivinen. Siinä ei ole myöskään selviä viitteitä syövän esiasteista.

ASC-H (*atypical squamous cells*) on epäkypsien solujen atypia, joka ei selvästi sovi HSIL-löydökseksi. HSIL-muutoksen mahdollisuus ei kuitenkaan ole pois suljettu.

LSIL (*Low grade squamous intraepithelial lesion*) on tyypillisiä atyyppisiä muutoksia kypsyneissä pintasoluissa. HPV-muutosten ja lievän limakalvon pintakerroksen dysplasian (*kasvuhäiriön*) yhdistäminen on merkittävää. Löydös määritellään lieväksi limakalvonsisäiseksi muutokseksi. Mikroskooppisia löydöksiä ovat koilosyytit, monitumaiset solut ja pienet pintasolut, joiden sytoplasma on oranssin sävyinen. (Nieminen.)

Keskivaikea ja vaikea limakalvon pintakerroksen kasvuhäiriö ja limakalvon pintakerrokseen rajoittunut syöpä (*carcinoma in situ*) on yhdistetty ja määritellään vahvaksi limakalvonsisäiseksi muutokseksi (HSIL, *high grade squamous intraepithelial lesion*). (Syöpäjärjestö 2007.)

3.3 Histologinen luokitus

Histologisen eli kudospillisen luokituksen olisi tarkoitus vastata sytologisten eli soluopillisten löydöksien vaikeusasteita. Käytännössä luokitusta ei pystytä tekemään aina näin. Dysplasialla tarkoitetaan sellaista levyepiteelimuutosta, jossa solut jakautuvat vilkkaasti

(*soluproliferaatio*). Tämä jatkuu myös basaalikerroksen ulkopuolella. Dysplasia-termiä käytetään myös yleisnimityksenä esiasteista. Termiä tulisi kuitenkin käyttää vain histologisista kudosuutoksista, eikä sytologisista muutoksista. Histologisia luokkia ovat kondyloma planum, dysplasia levis (*lievä muutos*), dysplasia moderata (*kohtalainen muutos*) ja dysplasia gravis (*vaikea muutos*). (Koivuniemi 1994: 69,74.)

Kondyloma planumiin luokitellaan useita kondyloomatyyppejä sekä matalan että korkean riskin tyyppejä. Mikroskoopissa näkyy koilosyyttien lisäksi dyskeratoottisia (*atyypisiä keratinisoituja*) soluja. Soluissa mitotoosiaktiivisuus voi olla lisääntynyt ja tumia voi olla kaksi tai useampia. Kondyloma planumissa pintakerroksen ja syvempien kerroksien välinen raja erottuu hyvin. (Koivuniemi 1994: 69,74.)

Dysplasia leviksessä (DL) esiintyy pintakerroksen soluja, joissa on suurentunut, lievästi hyperkromaattinen ja karkeakromatiininen tuma. Tuman koko vaihtelee ja muodossa saatetaan olla lievä epäsäännöllisyys. Muutokset paranevat muutaman vuoden sisällä itsestään ja syöpäriski on pieni. (Nieminen; Koivuniemi 1994:81; Käypähoito 2006 b.)

Dysplasia moderatassa (DM) esiintyy keskikerroksen soluja, joissa on suurentunut, hyperkromaattinen, karkeakromatiininen tuma ja tumakelmu poimuilee. Tuma-sytoplasmasuhde on jo selvemmin häiriintynyt kuin dysplasia leviksessä. Nukleolit eivät vielä ole korostuneet, mutta mitotooseja esiintyy epiteelin keskikerroksessa asti. Muutokset ovat pysyvämpiä kuin esiasteissa. Spontaania paranemista tapahtuu enää alle puolissa tapauksista. (Koivuniemi 1994: 81.)

Dysplasia graviksessa (DG) esiintyy syväkerroksen soluja, joissa on suurentunut, hyperkromaattinen, karkeakromatiivinen tuma ja jonka tumakelmu poimuilee. Tuman muoto vaihtelee ja siinä voi esiintyä pieniä ulokkeita tai sisäänpainauksia. Tuma-sytoplasmasuhde on selvästi suurentunut ja mitotooseja tavataan jo epiteelin ylimmissäkin kerroksissa. (Käypähoito 2006, b; Koivuniemi 1994:74.)

Dysplasia graviksen muutos ulottuu basaalimembraaniin (*tyvikalvo*) asti. Jos muutos läpäisee tyvikalvon, tulee kyseeseen invasiivinen syöpä, joka voi lähettää metastaaseja eli etäispesäkkeitä. Spontaania paranemista tapahtuu enää joka kolmannella ja syöpäriski on suu-

rentunut. (Käypähoito 2006 b; Koivuniemi 1994:74.)

4 IHMISEN PAPILLOOMAVIRUKSEN TUTKIMUSMENETELMÄT

Ihmisen papilloomavirusta voidaan tutkia Kättilöopiston sairaalan patologian laboratoriossa neljällä eri menetelmällä. Hybrid Capture 2 -testi on tutkimus, joka tehdään vain HPV-ryhmään kuuluvista gynekologisista irtosoluseulontanäytteistä. p16INK4a- ja Ki67-värjäykset ovat patologian laboratorion omia tutkimuksia, joita patologi pyytää tarvittaessa. Hematoksyliini-eosiinivärjäys on perustutkimus, jonka morfologian perusteella tehdään HPV-diagnoosi. HPV *in situ* -hybridisaatio on mahdollinen viides HPV:ta tutkiva tutkimus. Käyttönoton testauksen onnistuessa voi menetelmää käyttää Kättilöopiston sairaalan patologian laboratorion omiin tarpeisiin.

4.1 *In situ* -hybridisaatio (ISH)

In situ -hybridisaatio (ISH) on menetelmä, jossa indentifioidaan eli tunnistetaan spesifisiä nukleiinihappo-sekvenssejä kromosomi-, solu- sekä histologisella tasolla. "*In situ*" tarkoittaa "paikan päällä" eli kromosomissa tapahtuvaa geenikoettimen paikantamista. Menetelmä pohjautuu nukleiinihapon luonteeseen, jossa kaksijuosteisesta DNA:sta denaturoidaan (*DNA-säikeiden avaus*) yksijuosteinen. Yksijuosteisesta DNA:sta tehdään spesifisiä komplekseja (*hybridisoidaan*) merkkiaineella leimatun komplementaarisen DNA:n kanssa. (Ventana a.)

In situ -hybridisaatiomenetelmä perustuu DNA:n taipumukseen muodostaa kaksisäikeinen rakenne. Vastakkaisten juosteiden nukleotidit (G-C ja A-T) pariutuvat sopivissa olosuhteissa. Geenikoetin vastaa emäsekvenssiltään tiettyä geenijaksoa. Tämä leimataan tietyllä merkkiaineella ja hybridisoidaan vastaanottavaan kromosomiin. Merkkiaineen avulla voidaan havaita koettimen kiinnittymiskohta kromosomissa ja päätellä kyseisen geenin sijaintikohta kromosomissa. 100-500 nukleotidin pituiset leimatut koetinpätkät soveltuvat parhaiten *in situ* -hybridisaatioon. (Molekyyylisytologian työt 1997; Rantala - Lounatmaa 1998: 160; Liisa Halkki 2000.)

In situ -hybridisaatiota on tehty paljon muissa patologian laboratorioissa. Koska HPV-infektiota muutenkin arvioidaan koepalan tai irtosolunäytteen mikroskooppisella tarkastelulla, on ollut mielekästä yhdistää siihen vielä virustyyppistä kertova hybridisaatio. *In situ* -hybridisaation haittapuolia ovat olleet menetelmään kuluva pitkä aika sekä monet vaiheet. Näytteellä on ollut lukuisia esikäsittelyvaiheita, esimerkiksi proteaasin käyttäminen kudoksen morfologian säilyttämiseksi. Tulostus on ollut hidasta radioaktiivisilla koettimilla. Valotukset ovat vieneet jopa kolme viikkoa. Ei-radioaktiivisten hybridi-menetelmien (biotini- ja digoksigeniinileimatut koettimet) myötä *in situ* -hybridisaatio on tullut nopeammaksi. (Ollikka 2007.)

4.2 Kromogeeninen *in situ* -hybridisaatio (CISH)

Kätilöopiston sairaalan patologian laboratoriossa käytetään ei-radioaktiivista, kromogeenista *in situ* -hybridisaatiota. Kohteena oleva ihmisen papilloomaviruksen DNA (kudoksessa) saatetaan värilliseksi eri vaiheiden kautta ja tulos havaitaan mikroskooppisesti. (Ihalainen 2007.)

Kudosta tulee suojella autolyyttisiltä mekanismeilta, joten se on fiksoitava heti. Kudosa-
näytteet fiksoidaan 10 %:lla neutraali puskuri formaliinilla (NPF), joka vaikuttaa edullisimmin nukleinihappoihin. (Ventana a ja b.)

Alukkeina käytetään yksijuosteisia DNA-nauhoja, jotka on leimattu DNP:llä (eli Dinitro-Phenol). Koettimilla on ihmisen papilloomaviruksen genomi. Niiden kohteena ovat yleisimmät HPV-genotyypit, jotka on yhdistetty kohdunkaulakanavan syöpään. *In situ* -hybridisaatiossa käytetään koettimien sekoitusta, joka koostuu genotyyppien 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 ja 66 kaltaisista yksijuosteisista DNA-pätkistä. Nämä yksijuosteiset DNA-pätkät sopivat emäsekvenssiltään kohde-DNA:n vastinemäksiin. (Ventana c.)

Kromogeeninen *in situ* -hybridisaatio jaetaan viiteen eri vaiheeseen. Näitä ovat näytteen esikäsittely eli entsyymidigestio, denaturaatio, hybridisaatio ja koettimien lisäys, pesut (*stringency washes*) sekä detektio eli hybridin näkyväksi saattaminen. (Ventana a.).

Jokainen *in situ* -hybridisaation vaihe on merkityksellinen. Tulosten luotettavuuteen vaikut-

taa muun muassa näytteiden fiksoiminen oikeanlaisessa formaliinissa, näytteiden lämmitäminen oikeassa lämpötilassa sekä oikea suolakonsentraatio hybridisaation aikana. Liian korkea pH, pesulämpötila tai hybridisaationaikainen lämpötila voi aiheuttaa vääriä negatiivisia tuloksia. Tärkeää on myös sisäinen laaduntarkkailu eli jokaiseen ajoon tulisi liittää tunnettu negatiivinen ja positiivinen kontrollinäyte. (Jumppanen 2007.)

4.2.1 Esikäsittely eli entsyymidigestio

Värjäys alkaa lasien kuumennuksella leikkeiden kiinnittämiseksi. Laite poistaa laseilta parafiinin käyttämällä korkeaa lämpötilaa ja pesuliuosta (EZ Prep). Laseille tulee öljyä (LCS eli *Liquid cover slip*), jota laitetaan lasien alle sekä päälle. Alla oleva öljy kiinnittää lasin tukevammin alustalle ja lämpö leviää tasaisesti koko lasille. Päälle tulevan öljyn ansiosta reagenssit leviävät paremmin näytteeseen. (Ventana d ja e.)

Esikäsittelyssä eli entsyymidigestiossa poistetaan kohde-DNA:ta ympäröivät proteiinit. Tämä tapahtuu proteaasi 3-entsyymien avulla. Proteaasi 3-entsyymi lisää immunoaktiivisuutta. Se on endopeptidaasi, joka kuuluu seriiniproteaasiperheeseen. Se halkaisee kaikki peptidisidokset, eli se ei ole spesifi entsyymi. Tarkoituksena on saada reikiä tuman kalvoon, jotta koetin pääsee kohde-DNA:n läheisyyteen. Sitraattipuskuria eli Cell Condition Solution 2 (CC2) tarvitaan, jotta proteaasi voisi toimia formaliinissa fiksoidussa eli kiinnitetyssä kudoksessa. CC2 hydrolysoi formaliinin muodostamat kovalentit sidokset ja kudoksessa olevan formaldehydin. (Ventana d ja e.)

4.2.2 Denaturaatio

Denaturaatiosta alkaa varsinainen hybridisaatioprosessi. Denaturaation avulla kohde-DNA:n kaksoiskierteinen rakenne saadaan avattua. Yksisäikeinen rakenne mahdollistaa leimatun koettimen komplementaarisen pariutumisen kohde-DNA:n kanssa. DNA-liuos kuumennetaan noin 100 asteeseen. Tämä saa aikaan vastinnauhojen irtoamisen toisistaan, koska vetysidokset nukleotidien emästen välillä katkeavat. Denaturaatio on palautuva eli reversiibeli tapahtuma. (Suominen - Ollikka 2004:114; Ventana c.)

4.2.3 Hybridisaatio

Hybridisaatio vaiheessa käytetään hyväksi denaturaation reversiibeliä ominaisuutta. Hybridisaatiossa luodaan hybridejä eli pareja leimatuista koettimista ja kohde-DNA:sta sovittamalla nukleinihappoparit yhteen. Tämä vaatii spesifistä (alhaista) lämpötilaa ja suolakonsentraatiota. Suolakonsentraatio (SSC) auttaa koetinta tarttumaan kiinni kohde-DNA:han säätämällä ionikonsentraatiota. Kun lämpötilaa lasketaan, DNA:n komplementaariset vastinnauhat pariutuvat uudestaan. Liuoksen nopea jäähdytys voi kuitenkin estää nauhojen yhteenliittymisen, varsinkin pitkien DNA-nauhojen kohdalla. (Suominen - Ollikka 2004:114; Ventana a.)

4.2.4 Pesut

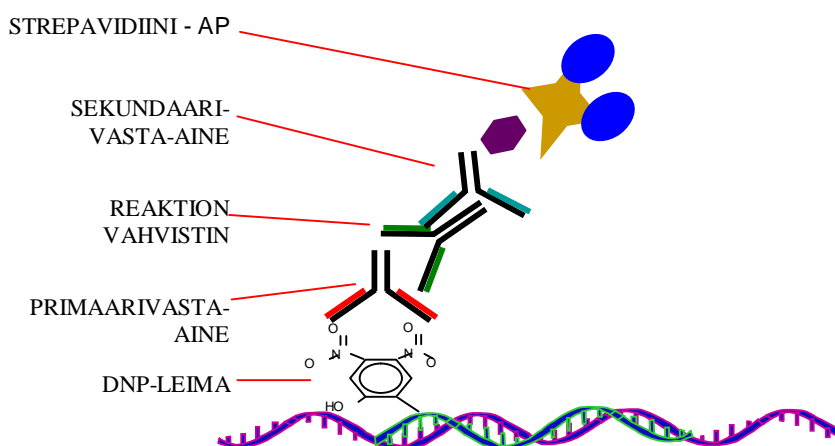
Näytteen pesu poistaa preparaatile epäspesifit hybridit eli DNA-säikeet, jotka ovat kiinnittyneet löyhästi tai ei ollenkaan. Tarkoituksena on saada irroitettua kaikki ylimääräinen koetin. Jäljelle jää ainoastaa koetin, joka on sitoutunut vastinemäksiinsä kromosomeissa. Tämänkin vaihe vaatii tiettyä lämpötilaa ja suolakonsentraatiota, eli mitä alhaisempi ionivahvuus ja korkeampi lämpötila, sitä tehokkaammat pesuolot. (Ventana a; Suominen - Ollikka 2004: 114.)

4.2.5 Detektio eli hybridin näkyväksi saattaminen

Kun leimattu koetin on sitoutunut kohde-DNA:han, täytyy kompleksiksi saada jollakin tavoin näkyväksi (ks. kuvio 1 s. 12). Tämän mahdollistavat primaari- ja sekundaarivasta-aineet. Primaarivasta-aine (Rabbit Anti- DNP) osoittaa DNP:llä leimatut alukkeet ja kiinnittyy kohdesekvenssiin eli koettimen leimaan (DNP). Tässä vaiheessa DNP-leimattu koetin on kiinnittynyt kohde-DNA:han. Primaarivasta-aineeseen kiinnittyy puolestaan vahvistusreagenssi (Mouse Anti-Rabbit Amplifier eli Amp). Nimensä mukaisesti kyseinen reagenssi vahvistaa reaktiota. (Ventana f.)

Vahvistusreagenssiin (Amp) liittyy biotiinilla päällystetty sekundaarivasta-aine (Biotin-labeled Goat Anti-mouse IgG). Sekundaarivasta-aineeseen liittyy alkaalinen fosfataasi, johon on konjugoitu streptavidini (Streptavidin-AP). Streptavidini-AP sisältää kromo-

geenisen entsyymien, joka mahdollistaa signaalin näkyväksi saattamisen. Jotta signaali saadaan värilliseksi, liitetään streptavidini-AP kompleksiin vielä NBT (nitro blue tetrazolium). NBT värittää kudoksen siniseksi sieltä kohdin, jossa on koettimen ja kohde-DNA:n yhdistelmiä. Muu kudos värjätään punaisella vastavärillä (Red Counterstain). Koska avidiinilla on suuri affiniteetti biotiiniin, värjäystulos tehostuu. (Rantala - Lounatmaa 1998: 141; Ventana f ja e; Ihalainen 2007.)



KUVIO 1. Kohde-DNA:n saattaminen näkyväksi eri komponentteja avulla (mukailtu lähteestä Ventana g).

4.3 Muut tutkimukseen liittyvät menetelmät

Näytteet on kerätty Hybrid Capture 2 -menetelmän avulla. Immunohistokemialliset värjaukset olivat mukana tutkimuksessa tukeakseen *in situ*-hybridisaation tuloksia. Hematoksyyliini-eosiinivärjäyksistä näki sen, onko alkuperäiset luokitukset muuttuneet histologisten kudoksenäytteiden leikkaamisen myötä.

4.3.1 Hybrid Capture 2 (HC2)

Hybrid Capture 2 -menetelmä perustuu HPV DNA:n nukleiinihappohybridisaation ilmentämiseen kemiluminesenssin avulla. Kohde-DNA:ta sisältävät näytteet hybridisoituvat spesifemmin HPV RNA-koettimeen. Syntyneet RNA:DNA-hybridit siepataan kuoppalevyille, joka on sivelty RNA:DNA-spesifisellä vasta-aineella. Immobilisoitujen (*kiinnitetty*) hybri-

dien on tarkoitus reagoida alkaalisen fosfataasin konjukoituhiin, RNA:DNA-hybridispesifiin vasta-aineisiin. Konjukoituneet vasta-aineet sitoutuu siepattuun hybridiin. Tämän seurauksena signaali alkaa vahvistua. Alkaalisen fosfataasin pilkkoessa substraattia syntyy valoa, jota mitataan luminometrillä suhteellisina valoyksiköinä (RLU). Syntyvän valon intensiteetti kertoo, sisältääkö näyte kohde-DNA:ta vai ei. (ks. liite 1) (Digene Corporation 2004.)

Jos mittauksessa saatu RLU-arvo on yhtä suuri tai suurempi kuin raja-arvo (1) on tulos positiivinen eli näytteessä on korkean riskin HPV:ta. RLU-arvon ollessa 0,98/0,99 näytteet tutkitaan varmuuden vuoksi uudestaan. Yleisesti kuitenkin raja-arvoja jotka ovat alle 1, pidetään negatiivisina eli näytteessä ei ole korkean riskin HPV DNA:ta. (Digene Corporation 2004.)

Korkean riskin ihmisen papilloomaviruksen genotyypeiksi on merkitty tässä testissä 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68, joista HPV16 ja HPV18 ovat suurimmat riskitekijät. Testi on tarkoitettu sellaisten naisten tunnistamiseen, joilla on lisääntynyt riski sairastua kohdunkaulan syöpään tai niille, joiden gynekologisessa irtosolunäytteessä on ilmennyt poikkeavuutta. HC2-käyttöohjeiden mukaan tämän testin tuloksien perusteella ei saa yksinään tehdä hoidon arviointia potilaalle. Menetelmä perustuu kvalitatiiviseen HPV DNA:n korkean riskin osoittamiseen. (Digene Corporation 2004.)

Virheellisiä tuloksia voi ilmetä, jos käytetään vanhentuneita reagensseja, ei noudateta koekeseen tarkoitettuja aika- ja lämpötilaohjeita tai pipetoidaan reagensseja vääränlainen määrä. On myös huolehdittava, etteivät käytössä olevat tarvikkeet kontaminoidu. Esimerkiksi sieppauskuoppalevyn kontaminoituessa syljestä, hiuksista tai bakteereista, voi testi antaa vääriä positiivisia tuloksia. Potilasnäytteiden lisäksi jokaiseen sarjaan tulee matalan riskin HPV-laaduntarkkailunäyte, korkean riskin HPV-laaduntarkkailunäyte, negatiivinen kontrolli sekä korkean riskin HPV-kalibraattori (ks. liite 1). (Digene Corporation 2004.)

4.3.2 Immunihistokemialliset (IHC) menetelmät

Immunohistokemiallisella menetelmällä pyritään tunnistamaan kudusrakenteet ja solutyypit

terveissä sekä sairaissa kudoksissa. Immunohistokemialla osoitetaan antigeeni kudosleikkeestä sille spesifisellä vasta-aineella. Vasta-aineet ovat plasmasolujen tuottamia seeruminproteiineja, joilla on kaksi identtistä kevytketjua ja kaksi identtistä raskasketjua. Ketjut yhdistyvät rikkisilloilla Y-muotoon. (Rantala ym. 1998:134.)

Kudosleikettä käsitellään spesifisen primaarivasta-aineen kanssa. Primaarivasta-aineella tarkoitetaan antigeenille spesifistä vasta-ainetta, jossa tapahtuu värjäyksen ensimmäinen inkubaatio. Vasta-aine tunnistaa tietyn antigeenin epitoopit eli sen kohdan mihin vasta-aine sitoutuu. Sekundaarivasta-aine sitoutuu primaariin vasta-aineeseen, joten sen täytyy koostua eläimen immunoglobuliinia vastaan. Entsyymillä, esimerkiksi peroksidaasilla, voidaan osoittaa primaarivasta-aineen paikantuminen kudosleikkeessä. Peroksidaasin aktiivinen osa on rautaa sisältävä hemateiini, joka muodostaa kompleksin vetyperoksidaasisubstraatin kanssa ja hajooa tällöin vedeksi sekä happiatomiksi. Tällöin spesifinen tuman rakenne värjäytyy. (Rantala ym. 1998: 133.)

Kontrollit ovat olennainen osa immunohistokemiallisia värjäyksiä tulkittaessa. Negatiivisesta kontrollista näkee epäspesifisen värjäytymisen, koska siitä puuttuu antigenille spesifi primaarivasta-aine. Positiivisista kontroleista pystyy arvioimaan värjäyksen teknisen onnistumisen ja herkkyuden. Antigeeninegatiiviseen tulokseen ei voi aina luottaa, vaikka positiivinen kontrolli olisikin värjäytynyt. Joissain tapauksissa epitoopit ovat voineet tuhoutua näytteestä tai käsittelyssä on voinut tapahtua jokin virhe. Virhelähteitä ovat esimerkiksi liian voimakas fiksaatio, ylikuumentunut parafiini tai väärä esikäsitteleminen. Laadukkaassa näytteessä on selkeät värit, riittävä värin intensiteetti, minimaalinen taustavärjäytyminen ja puhdas negatiivinen kontrolli. Negatiivista tulosta ei saa pitää varsinaisena tuloksena. Ainoastaan hyvin säilynyt ja laadukkaasti leikattu (positiivinen) kudos on luotettava tiedonlähde. (Rantala ym. 1998:158-159)

Taustavärjäytyminen voi olla tutkittavan antigeenin aiheuttamaa eli spesifistä tai epäspesifistä. Spesifistä taustaa aiheuttaa esimerkiksi fibriini, tyroglobuliinit ja immunogeenit. Pe-suilla poistetaan sitoutumaton vasta-aine ja on varottava leikkeen hajoamista. (Rantala ym.1998:157)

4.3.3 p16INK4a menetelmän periaate

p16INK4a on proteiini, joka osallistuu solunjakaantumisen säätelyyn normaaleissa soluissa. On havaittu, että sen määrä soluissa kohoaa runsaasti korkean riskin ihmisen papilloomaviruksen aiheuttamissa solumuutoksissa. P16INK4a ilmenee normaaleissa sekä korkean riskin HPV:n esiasteissa. (Dacota Cytomation a.)

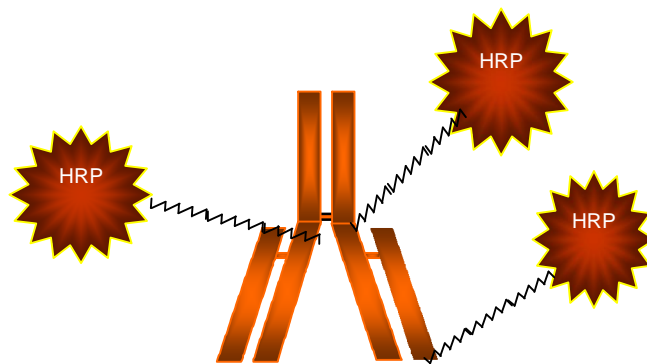
Korkean riskin HPV:n onkogeeni E7 kiinnittyy retinoplastoproteiiniin (Rb-proteiini), jolloin se inaktivoituu. Inaktiivisen Rb-proteiinin takia p16INK4a-proteiinin negatiivinen "feedback" ei toimi, joten solut alkavat tuottaa suuria määriä p16INK4a-proteiinia. Näin ollen p16INK4a-proteiini on hyödyllinen biomarkkeri korkean riskin HPV:n aiheuttamien solumuutosten etsimisessä. (Dacota Cytomation a.)

p16INK4a-proteiinia voidaan määrittää immunohistokemiallisella värjäyksellä, jossa primaarivasta-aineena käytetään p16INK4a-vasta-ainetta. Vasta-aine kiinnittyy solun tumassa ja solulimassa oleviin antigeenin epitooppeihin eli determinantteihin. (Dacota Cytomation a.)

Värjäys tehdään automaattisella Ventanan Benchmark-värjäyslaitteella. Kittinä käytetään Ultra View Universal DAB:ia. Värjäys alkaa lasien kuumennuksella leikkeiden kiinnittämiseksi. Laite poistaa lasilta parafiinin käyttämällä korkeaa lämpötilaa ja pesuliuosta (EZ Prep). Laseille tulee öljy (LCS eli Liquid cover slip), jonka alla reagenssit leviävät tasaisesti. Esikäsittelyliuos (CC1 eli Cell condition1) on EDTA-pohjainen puskuri. Esikäsittely on mieto, joten inkubaatioaika on lyhyt. Esikäsittelyliuos paljastaa antigeenin epitoopit, jotka ovat peittyneet formaliinin vaikutuksesta. Tämän jälkeen laite suorittaa endogeenisen (*sisäinen muutos*) peroksidaasiaktiivisuuden vaimennuksen inhibiittorin avulla. Endogeenisen entsyymiaktiiviteetin vaimennus tehdään 3 %:lla vesi-vetyperoksidiliuoksella. Käsittely tehdään kudoksessa mahdollisesti olevan leimana käytetyn entsyymin poistamiseksi. Peroksidaasiaktiivisuutta esiintyy punasoluissa, myoglobiinissa, granulosyyttien ja monosyyttien sytokromissa sekä maksan ja munuaisten katalaaseissa. (Ventana g.)

Primaari p16INK4a-vasta-aine lisätään menetelmässä käsin. Laite inkuboi leikkeitä 10 minuuttia. Laite pesee Reaction Bufferilla sitoutumattoman vasta-aineen ja muiden reagenssien jäämät pois. Reaction Bufferin jälkeen lisätään multimeeri-kompleksi (ks. kuvio 2 s.16),

joka sisältää sekundaarivasta-aineen sekä siihen konjugoidun entsyymin (HRP eli Horseradish Peroxydase). Entsyymi on konjugoitu suoraan sekundaarivasta-aineeseen niin sanottujen pitkien käsien ("long-arm-linkers") avulla ilman suurta polymeerirankaa, mikä rajoittaisi herkkyyttä ja tarkkaa värjäytymistä. Multimeeritekniikka rakentuu multimeeriseen glykopolysakkaridimolekyylisiin, joka on riittävän pieni pystyäkseen kiinnittymään ahtaisiin kohteisiin. Multimeerikitti on myös biotiinivapaa ja tämän ansiosta taustavärjäytyminen vähentyy. Tämän jälkeen lisätään substraatti (H_2O_2) ja kromogeeniväriaine (DAB), joka on biotiinivapaa ja auttaa lyhentämään värjäysaikaa. Kromogeenin ja substraatin jälkeen lisätään kuparia, joka muuttaa kromogeenin värin havaittavaksi eli punaruskeaksi. Lopuksi laite värjää näytteiden tumat ja taustan hematoksyliinillä ja sinistysreagenssilla, joka antaa violetin värisävyn. (Ventana g.)



KUVIO 2. Multimeerikompleksi sisältää sekundaarivasta-aineen ja siihen konjugoidun entsyymin (mukailtu lähteestä Ventana h).

4.3.4 Ki67 menetelmän periaate

Ki67-analyysi perustuu immunohistokemialliseen menetelmään. Ki67-värjäyksen avulla mitataan yleensä kasvufraktioita tuumorisolusta. Ki67-proteiinia tavataan jakautuvien solujen tumissa ja se on solusyklin G1, G2 ja S-vaiheen vasta-aine. Ki67 ei tavata lepovaiheessa olevissa soluissa. Ki67 ennustaa jakautuvien solujen määrällä kasvaimen kasvun käyttäytymistä. Menetelmän päämääränä on määritellä tärkeät tuumorisolujen ominaisuudet sekä aktiivisesti jakautuvien tuumorisolujen osuus, jotka kasvattavat syöpäsolujen määrää. (Cancer-encyclopedia 2007.)

Ki67-positiiviset solut esiintyvät normaalisti tyvisolukerroksessa eli basaalisolukerroksessa. Positiivisten solujen esiintyminen pinnan solukerroksissa kertoo häiriintyneestä jakautumisesta ja se on merkki jostain muutoksesta. (Cancer-encyclopedia 2007.)

Ki67:n reagenssit ja periaatteet ovat miltei samat, kuin p16INK4a:ssa. Poikkeuksen tekevät CC1:n ja primaarivasta-aineiden inkubaatioajat. CC1-käsittely p16INK4a:lla on mieto, jolloin inkubaatioaika on lyhyt. Ki67:lla inkubaatioaika on pidempi, joten CC1-käsittely on standardi. Eli CC1-reagenssi on sama, mutta vain käsittelyaika eri. Toinen eroavaisuus liittyy Ki67-primaarivasta-aineen ja p16INK4a-primaarivasta-aineen eri pituisiin inkubaatioaikoihin.

4.3.5 Hematoksyliini-eosiinivärjäyksen periaate

Hematoksyliini-eosiini (HE) on yleisin histologinen värjäys. Värjäys erottaa hyvin kudoksen komponentit toisistaan. Kationinen hematoksyliini tarttuu hyvin happamiin anionisiin DNA-ryhmiin, jolloin tumat värjäytyvät mustiksi. Eosiini tarttuu anionisena yhdisteenä emäksisiin kationisiin ryhmiin. Sytoplasma ja matriksi värjäytyvät vaaleanpunaisiksi. (Siironen - Helminen 2004.)

Eosiinilla värjättäessä vedellä tehtävä differentointi määrää kudokseen muodostuvan lopullisen sävyn. Hematoksyliini-eosiinivärjäyksellä saadaan ensimmäinen käsitys solun rakenteesta. Värjäytyvyyteen vaikuttaa muun muassa pH, kudoksen fiksaatio, reaktioaika ja lämpötila, preparaatin paksuus, tukiaineet ja asianmukaiset välineet sekä puhtaus. (StainsFile 2005.)

5 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET

Bewetra ynnä muut ovat tutkineet HPV:ta Ventanan *in situ* -hybridisatiomenetelmällä. Materiaalinaan heillä oli nestemäiset gynekologiset irtosolunäytteet sekä jatkotutkimuksissa otetut biopsianäytteet. Näytteet olivat HPV DNA-negatiivisia sytologisen luokituksen mukaan. Jälkeenpäin otettu biopsia toi kuitenkin ilmi CIN-muutoksia histologisessa luokituksessa. Tutkimuksessa oli mukana 395 hedelmällisessä iässä olevaa oireetonta naista, joilla

oli todettu ASC-US-diagnoosi. Heiltä tutkittiin ihmisen papilloomavirusta *in situ* –hybridisaatiomenetelmällä (Ventana Inform HPV test, Tuson, Arizona, U.S.A). Kaikki tutkimukset (sytologinen, ISH, histologinen) arvioitiin itsenäisesti muista vastauksista mitään tietämättä. Vertailtaessa eri menetelmiä tulokseksi saatiin pieni, mutta tieteellisesti merkitsevä virhemarginaali (14 %). Artikkelissa todettiin, että pelkästään HPV ISH-diagnoosin perusteella ei saisi tehdä diagnoosia, vaan huomioon tulisi ottaa taudinkuvaan liittyvät muutkin tekijät ja tutkimukset. (Bewtra - Xic - Soundararajan - Catalica - Hatcher 2005: 127-131.)

Schillerin ynnä muiden tutkimuksessa vertailtiin Hybrid Capturen 2 (HC2) -testin ja kromogeenisen *in situ* -hybridisaation (CISH) kykyä löytää high risk HPV (HR-HPV) eli korkean riskin HPV. Tutkimuksessa oli 401 gynekologisista nestemäisistä irtosolunäytteistä saatua sytologista näytettä, jotka olivat saaneet ASC-US-diagnoosin. HPV-positiivisia näytteitä yhdellä tai useammalla menetelmällä oli 101 (25,2 %) tapauksessa. HC2-menetelmällä positiivisia näytteitä oli 83 (20,7 %) ja CISH-menetelmällä 38 (9,5 %). CISH:in positiiviset ominaisuudet riippuvat paljon menetelmään perehtyneistä näytteiden tulkitsijoista. HC2-menetelmä todettiin tehokkaammaksi ja kvantitatiivisesti hyödyllisemmäksi. Useamman kerran testattaessa näytettä tulokset vaihtelivat jonkin verran. Tämä kertoo siitä, että nestemäiset gynekologiset irtosolunäytteet eivät ole täysin homogeenisia. (Shiller ym. 2004: 537-45.)

Kongin ynnä muiden tutkimuksessa, joka koski korkean riskin HPV:ta, todettiin immunohistokemian ja tarkemmin p16INK4a:n ylivoimaisuus HPV *in situ* -hybridisaatioon nähden. Tutkimuksessa vertailtiin kolmea eri CISH-menetelmää ja kahta eri p16INK4a-menetelmää. Tulosten perusteella p16INK4a todettiin edustavimmaksi menetelmäksi tutkittaessa gynekologisia biopsioita, joissa oli histologisesti epämääräinen dysplasia. Menetelmällä on hyvä saatavuus. Kaikki tulkinnat ovat vertailtavissa niiden korkean sensitiivisyyden ja spesifisyyden ansiosta. (Kong - Balzer - Patterson - Longacre 2007: 33-43.)

6 TUTKIMUSONGELMAT

- A) Miten HPV *in situ* -hybridisaatiomenetelmä soveltuu Kätilöopiston sairaalan patologian laboratorion tutkimusvalikoimaan?
- B) Kuinka HPV *in situ* -hybridisaatiomenetelmä voidaan todeta luotettavaksi?
- C) Kuinka menetelmän kontrollit toimivat?

Tuloksien luotettavuuteen vaikuttaa kontrollien toimivuus ja virhelähteiden minimoiminen. Luotettavien tuloksien perusteella todetaan, voiko *in situ* -hybridisaation ottaa päivittäiseen käyttöön Kätilöopiston sairaalan patologian laboratoriossa.

- D) Kuinka muut värjäykset (p16INK4a, Ki67) tukevat HPV *in situ* -hybridisaation käyttöönottoa?

Näiden proteiinien (p16INK4a ja Ki67) eli merkkiaineiden havaitseminen ISH-positiivisissa näytteissä kertoo onnistuneesta empiirisen tutkimuksen lopputuloksesta. Immunohistovärjäyksissä tutkitaan merkkiaineiden p16INK4a- ja Ki67-proteiinien esiintymistä kudoksessa. Näitä esiintyy positiivisten HPV *in situ* -hybridisaatiotuloksien yhteydessä.

- E) Kuinka kondyloma planum-, dysplasia levis-, dysplasia moderata- ja dysplasia gravis-diagnoosiluokat auttavat HPV *in situ* -hybridisaation käyttöönotossa?

Ihmisen papilloomavirukset esiintyvät jokaisessa neljässä eri diagnoosiluokassa, mutta eri tavalla. Patologi on tehnyt nämä diagnoosit HE-värjätyistä näytteistä. Tutkimuksemme avulla selvitämme, kuinka paljon viruksia esiintyy jokaisessa diagnoosiluokassa. Diagnoosiluokat lievimmästä muutoksesta pahimpaan ovat kondyloma planum, dysplasia levis, dysplasia moderata ja dysplasia gravis.

7 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN

Empiiriseen tutkimukseen kuului erilaisia työvaiheita. Käytetyt tutkimusmenetelmät olivat luonteeltaan sekä kvalitatiivista että kvantitatiivista. Kvalitatiivinen eli laadullinen tutkimus pyrkii paljastamaan säännönmukaisuuksia, kun taas kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus pyrkii paljastamaan tosiasioita mahdollisimman kokonaisvaltaisesti. Tutkimuksessa nämä tukevat toisiaan. (Hirsjärvi 1998, 161.)

Tietoa kerättiin eri värjäysmenetelmien avulla (ISH, IHC, HE). Tuloksia analysoitiin mikroskopian jälkeen luokittelemalla niitä eri kriteerien mukaan. Tulokset kirjattiin mikroskopian yhteydessä taulukkoon ja tekstissä tuloksia havainnollistettiin prosentuaalisesti.

7.1 Näytteiden keräys

Kätilöopiston sairaalan patologian laboratorioon saapuu joukkoseulonnan gynekologisia irtosolututkimuksia noin 36 000 vuodessa. Näistä 1/3 kuuluu niin sanottuun HPV-ryhmään. Tähän ryhmään kuuluvilta naisilta otetaan sekä perinteinen gynekologinen irtosolunäyte että HPV-näyte HPV DNA-testiä varten. HPV DNA-testi tehdään Hybrid Capture 2 -menetelmällä, jossa osoitetaan kudoksesta ihmisen papilloomaviruksen DNA. Testillä saatavat tulokset ovat joko negatiivisia tai positiivisia korkean riskin HPV:lle. Mikäli testituloksena on negatiivinen, ei näytelasia tutkita lainkaan. Testituloksen ollessa positiivinen näytelasi tutkitaan normaalisti. Poikkeuksen tähän kuitenkin tuovat naiset, joilla on vuoto-oireita. Heidän gynekologinen irtosolunäytelasinsa tutkitaan normaalisti, vaikka testituloksena olisikin negatiivinen. (ks. Liite 2)

Nainen kutsutaan kolposkopiaan (*gynekologinen tähystys*) HPV-testin ollessa positiivinen sekä tutkitulta gynekologiselta irtosolulasilta löytyessä solumuutoksia, jotka ovat sytologiassa luokituksessa LSIL tai vakavampia. Tarvittaessa häneltä otetaan biopsioita (*koepala*). Näistä kolposkopiassa otetuista histologisista biopsianäytteistä koostuu tutkimuksen materiaali HPV *in situ* -hybridisaatiomenetelmän sisäänajoa varten. (Ihalainen 2006.)

Biopsianäytteet oli jo tutkittu ja diagnosoitu. Työssä käytetyt biopsianäytteet jakautuivat histologisen luokituksen mukaan. Diagnoosiluokat olivat kondylooma planum, dysplasia

levis, dysplasia moderata sekä dysplasia gravis. Tutkimuksen materiaali kerättiin vuoden 2004 jälkeen otetuista biopsia- ja kaavintanäytteistä. Näytteidenoton välissä tuli olla korkeintaan puoli vuotta. Jos näytteidenotosta on kulunut enemmän kuin puoli vuotta, HPV-infektio on voinut jo parantua.

Tutkimus aloitettiin keräämällä tarvittavat näytteet HUSLAB:n Qpati-tietokannasta sytologisen luokituksen perusteella (LSIL ja HSIL). Näistä näytteistä selvitettiin niiden histologinen diagnoosi, jotta potilaiden tietosuoja säilyisi. Diagnoosiluokkia oli neljä, joista kustakin valittiin kymmenen näytettä. Näiden lisäksi otettiin yksi negatiiviseksi todettu blokki, josta leikattiin kaksi kontrollia jokaiseen aioon. Potilasnäytteitä kerättiin yhteensä 40. Vaiheeseen liittyviä mahdollisia virhelähteitä oli muun muassa väärin näyteblokkien kerääminen mukaan työhömmme ja muistiinpanomerkintöjen väärinkirjaaminen.

7.2 Näytteiden leikkaaminen

Näytteet oli jo valmiiksi valettu parafiiniin. Niiden käsittely aloitettiin leikkaamisesta. Käytössä oli uudemmat mikrotomit. Kustakin parafiiniblokista leikattiin lasit värjäyksiä (*in situ*-hybridisaatio, p16INK4a, Ki67, HE) sekä kontrolleja varten. HE-värjäykseen ei otettu kontrollia, mutta muihin menetelmiin laitettiin positiivinen kontrolli samaan lasiin näytteen kanssa. *In situ* hybridisaatiossa oli kaupallinen positiivinen kontrolli. Immunohistokemiallisissa värjäyksissä positiivisena kontrollina toimi tunnettu positiivinen portiobiopsia. Kaikissa näytteissä negatiivisena kontrollina toimi tunnettu negatiivinen portiobiopsia. Yhtä näytettä kohden laseja tuli tällöin viisi. Yhteensä laseja tulee 184.

Leikkeiden paksuutena oli 4µm. Leikkeet leikattiin uusimmilla ja kehittyneimmillä mikrotomeilla. Niiden avulla saatiin rypyttömämpiä ja yhtä paksuja leikkeitä. Tämä oli tärkeää senkin vuoksi, että blokkeja leikkasi kolme leikkaajaa. Lisäksi jokaisen leikkaustyyli saattoi vaikuttaa leikkeiden paksuuteen sekä rypyttömyyteen. Tutkimuksessa käytettiin Superfrost Plus -laseja eli adhesiivilaseja, joiden ansiosta näyte kiinnittyi paremmin. Lasit nimettiin numeroin, jotta henkilöllisyys ei paljastuisi.

7.3 Näytteiden värjäys

Jokaista värjäystä käsiteltiin erikseen, sillä menetelmät ja värjäyksen suoritukset poikkeavat toisistaan. Hybrid Capture 2 -menetelmää käytettiin vain materiaalin keräystä varten, joten sitä ei käsitellä tässä kohtaa.

7.3.1 *In situ* -hybridisaatio

Benchmark-laite huollettiin ensimmäiseksi Ventanan ohjeiden mukaan. Huoltotoimenpiteiden tarkoituksena oli puhdistaa laite. Toimenpide lisäsi luotettavuutta muun muassa vähentämällä taustavärjäytymistä. Huolto aloitettiin tyhjentämällä 20 litran reagenssilaimenninastiat (Reaction Bufferin, SSC:n ja EZ Prepin) ja pesemällä ne huolellisesti hypokloridilla. Samalla laitetta inkuboitui tunti, jonka jälkeen se huuhdeltiin vesijohtovedellä. Viimeinen huuhtelu suoritettiin tislatulla vedellä. Instrumenttien dekontaminaatio aloitettiin irrottamalla seitsemän astiaa koneesta. Tämän jälkeen koneelle suoritettiin toimintakoe kaksi kertaa. Koe valittiin koneen valikosta. Reagenssiastiat tyhjennettiin ja pestiin useaan kertaan kuumalla vesijohtovedellä. Tämän jälkeen valmistettiin dekontaminaatioliuos eli puhdistusliuos Sanogene-jauheesta. Jauhe sekoitettiin 2,5 litraan vettä. Pesuliuosta lisättiin jokaiseen astiaan, jonka jälkeen ne asetettiin ja yhdistettiin takaisin Benchmarkin laitteeseen. Laitteelle suoritettiin jälleen toimintatesti. Tämän jälkeen puhdistusliuos jätettiin inkuboitumaan 15 minuutiksi, jonka jälkeen toistettiin sama toiseen kertaan.

Reagenssiastiat irrotettiin koneesta. Tämän jälkeen koneelle tehtiin toimintaohjelma kaksi kertaa. Astiat tyhjennettiin pesuliuoksesta ja huuhdeltiin useaan kertaan vesijohtovedellä ja viimeiseksi tislatulla vedellä. Tämän jälkeen ne täytettiin tislatulla vedellä ja asetettiin takaisin laitteeseen. Koneelle suoritettiin toimintaohjelma, jonka ansiosta laite puhdistui pesuaineesta. Reagenssiastiat irrotettiin toistamiseen laitteesta. Astiat tyhjennettiin, puhdistettiin alkoholilla ja niiden annettiin kuivua. Lopuksi reagenssiastiat täytettiin omilla reagensseillaan ja liitettiin koneeseen. Sen jälkeen koneelle suoritettiin viimeinen toimintatesti (ks. Liite 3).

Ennen kudosleikkeiden laittamista Benchmarkin laitteeseen niitä inkuboitui lämpökaapissa + 60 asteessa tunnin ajan. Tällöin leikkeet kiinnittyivät paremmin lasille. Tehtiin viivakoo-

ditarrat, joista ilmenivät näytteen numero ja värjäyksen nimi. Liuosten riittävyys tarkistettiin ja jätettä tyhjennettiin tarvittaessa. Reagenssitelineeseen asetettiin huoneenlämmössä säilytettävä ISH Red Counterstain -reagenssi. Reagenssiteline asetettiin paikoilleen ja ohjelma käynnistettiin. Lisäksi reagenssitarkistuksien kohdat ruksattiin. Lasien lukumäärä tarkistettiin ja kone käynnistettiin. Värjäys oli valmis noin kuuden tunnin kuluttua.

Benchmark-laitteen ISH-ohjelma suoritti monta eri vaihetta analyysin/värjäyksen aikana. Aluksi leikkeet lämmitettiin ja niitä inkuboitiin. Tämän jälkeen kone poisti parafiinin EZ Prep:in ja lämmön avulla. Leikkeille lisättiin öljyä (Coverslip). Seuraavaksi laite suoritti leikkeille entsyymidigestion. Ensimmäisessä vaiheessa lisättiin Cell Condition 2 -liuos (CC2). Samalla leikkeelle tehtiin lämpöesikäsittely. CC2 eli sitraattipuskuri toimii pH 6:ssa. Toisessa vaiheessa lisättiin proteaasi 3 ja SSC.

Leikkeiden prehybridisaatio tapahtui HybReady-liuoksen avulla. Tässä vaiheessa leikkeille lisättiin koetin. Lämpötila nostettiin 95 asteeseen (+ inkubointi) ja sen jälkeen laskettiin 52 asteeseen (+ inkubointi). Tämän jälkeen laite inkuboi näytteitä vielä kaksi tuntia, jonka aikana leimattu koetin liittyi kohde-DNA:han. Hybridisaatio vaiheen jälkeen lasilta pestiin pois epäspesifit DNA-sekvenssit.

Hybridien muodostuttua leikkeille lisättiin primaarivasta-aine (Anti-DNP eli Dinitro-Phenol). Se sitoutui hybridien leimaan, eli DNP:hen. Signaalin vahvistamiseksi lisättiin Amp-reagenssi ("vahvistusreagenssi"). Sen jälkeen lisättiin sekundaarivasta-aine (Biotin-IgG), joka sitoutui edelliseen kompleksiin. Seuraavaksi lisättiin reagenssi, joka sisältää streptavidini-alkalisen fosfataasin (SA-AP). Sen jälkeen lisättiin Enhancer-reagenssi, joka kiihdytti reaktiota. BCIP ja NBT-reagenssi lisättiin, jotta Human papillomavirus saatiin näkyväksi. NBT-reagenssi värjäsikin HPV:n siniseksi. Lopuksi lisättiin taustaväri (Red Counterstain), joka värjäsikin taustan punaiseksi.

Lasit otettiin laitteesta ja pestiin kuumassa vedessä Tisko-pesuaineella noin 30 sekunnin ajan. Niitä huuhdeltiin noin minuutin verran ylimääräisen öljyn irrottamiseksi lasilta. Lopuksi lasille suoritettiin nouseva alkoholisarja, joka päättyi ksyleeniin. Lasit peitettiin peitinkalvoautomaatilla. (ks. liite 4)

7.3.2 Immunohistokemialliset värjäykset p16INK4a ja KI67

Ennen värjäystä leikkeet olivat lämpökaapissa + 60°:ssa noin tunnin. Tehtiin viivakooditarat, joissa oli näytteiden numerot ja värjäyksen nimi. Liuosten riittävyys tarkistettiin ja jäteastia tyhjennettiin. Reagenssiteline asetettiin paikalleen ja ohjelma käynnistettiin ja reagenssitarkistuksien kohdat ruksattiin. Lasien määrä merkittiin ja kone käynnistettiin. p16INK4a-vasta-aine tuli laimentaa suhteessa 1:50. Laite ilmoitti, koska vasta-aine lisätään lasille. Yhdelle lasille tuli yhteensä 100µl:aa vasta-ainelaimennosta. Värjäyksen päätyttyä lasit asetettiin värjäyskelkkaan. Se laitettiin astiaan, jossa oli muutama tippa Tiskoastianpesuainetta. Laseja pestiin lämpimällä vedellä noin 30 sekunnin ajan. Sen jälkeen niitä huuhdeltiin lämpimällä vedellä noin minuutin ajan. Tämän jälkeen laseille suoritettiin aquasta lähtien nouseva alkoholisarja, jonka jälkeen lasit laitettiin ksyleeniin. Lopuksi lasit peiteltiin peitinkalvoautomaatilla (ks. liite 5-6).

7.3.3 Hematoksyliini-eosiinivärjäys

Hematoksyliini-eosiini-värjäys tehtiin värjäysautomaatilla. Värjäys alkoi parafiinin poistolla ksyleenin avulla, jotta saatiin esiin reaktiiviset ryhmät. Lasit vietiin laskevaan alkoholisarjaan, jossa tapahtui ksyleenin poisto absoluuttisella sekä 96 %:lla alkoholilla. Näyte saatettiin vesiliukoseen muotoon. Varsinainen värjäys alkoi Weigertin hematoksyliinitumavärillä. Liiallinen väri huuhdeltiin kraanavedellä. Sen jälkeen tumaväri differentoitiin 1 % HCL:llä ja differentointi pysäytettiin kraanavesihuuhtelulla. Taustavärjäys tapahtui Eosin Y:llä. Värjäyksen jälkeen leike käsiteltiin absoluuttisella alkoholilla, jolloin tapahtui dehydraatio (*veden poisto*). Lopuksi tuli ksyleeni, joka mahdollisti peitinkalvoautomaatin käytön (ks. liite 7).

7.4 Näytteiden mikroskopointi

Kontrollileikkeet mikroskopointiin ja niiden värjäytyvyydet tulkittiin. Negatiivisesta kontrollista näkyi epäspesifinen värjäytyminen hyvin, koska siitä puuttui antigeenispesifinen primaarivasta-aine. Positiivisesta kontrollista pystyi arvioimaan värjäyksen herkkyyden. Luotettavaa tietoa saatiin ainoastaan hyvin säilyneestä kudoksesta ja laadukkaista leikkeistä. Hyvin onnistuneen värjäyksen tuntomerkkejä olivat selkeä värin paikantuminen, riittävä

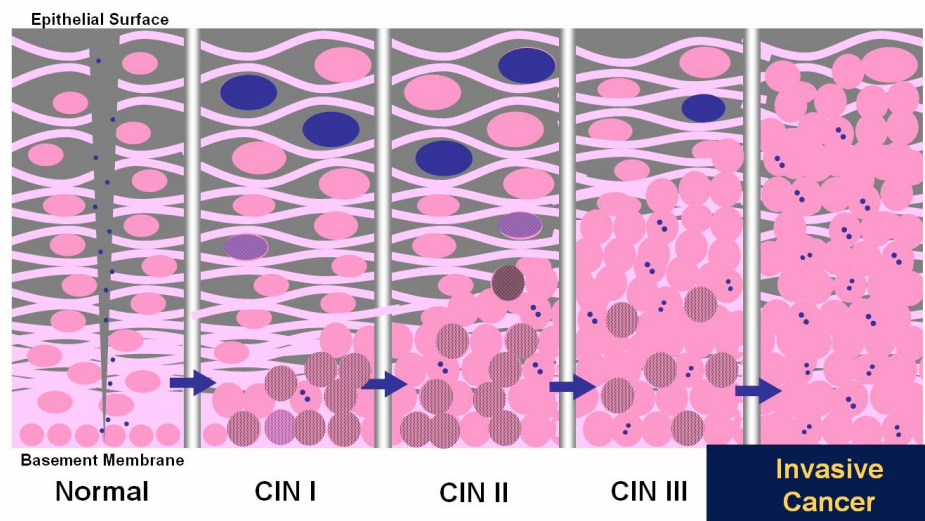
värin intensiteetti, värin intensiteetin vaihtelut tuumorisoluisissa, minimaalinen taustavärjäytyvyys ja puhdas negatiivinen kontrolli. (Rantala ym. 1998.)

Näytteet oli saatettu tarkastelukuntoon tässä vaiheessa. Näytteitä tulkitsivat opinnäytetyön tekijät, ohjaava bioanalytikko sekä patologi. Muutamia näytteitä katsottiin mikroskoopilla ensin ohjaavan bioanalytikon kanssa. Tämä antoi selkeyden värjäyksen antamaan visuaaliseen kuvaan ja siihen, kuinka näytettä tulkitaan. Joka näytteestä mikroskoipoitiin koko kudospala, koska HPV DNA-virusten kopiot voivat sijaita missä kohdassa kudosta tahansa näytemateriaalista riippuen. ISH-värjäyksessä oli tärkeää fokusoida eli tarkentaa mikroskooppia jatkuvasti, jotta pienimmätkin kopiomäärät tulivat näkyviin.

7.5 Värjäyksen kriteerien määrittäminen

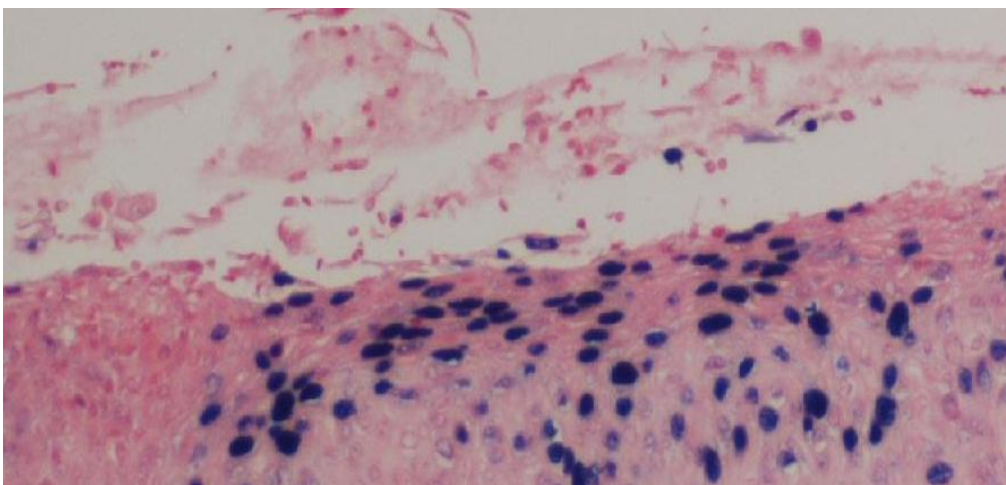
Pääpaino tulkinnoissa pysyi HPV *in situ* -hybridisaation antamissa tuloksissa. Niistä tehdyn taulukon ja mittausmenetelmän yhteenvedon perusteella selvisi luotettavasti, oliko tutkimus kannattanut eli pystyikö *in situ* -hybridisaatiomenetelmän ottaa käyttöön. ISH:n tuloksia tulkittaessa ”täplien” oli sijaittava tumien sisällä. Jos näin ei ollut, tulos oli tulkittavissa artefaktana tai taustavärjäytymisenä. Värjäytyneiden viruskopioiden laatu ja määrä voi vaihdella riippuen kudospalan morfologiasta. Positiivisessa ISH-näytteessä vain tumien sisällä olevan HPV DNA:n kuului värjäytyä siniseksi ja kaiken muun punaiseksi. Samassa kudospalassa voi esimerkiksi olla dysplasia moderata ja dysplasia levis, jolloin viruskopioiden ilmeneminen ei ole yksiselitteistä. (Grogan ym 2006).

Viruskopioita esiintyi dysplastisissa diagnoosiluokissa eri tavalla. Kuvio 3 (s.26) kertoo HPV-infektion etenemisestä kudoksessa. Virus tunkeutuu solun tumaan. Virus infektoi syvemmät basaalisolut, jonka jälkeen viruksien määrä alkaa lisääntyä. Virukset alkavat muuntamaan soluja. Alussa on enemmän episomaalisia soluja. Soluihin on pakkautunut suuri määrä viruksia. Vakavammissa solumuutoksissa virukset ovat integroituja ja viruskopioiden määrä pienentyy. (Ventana b.)

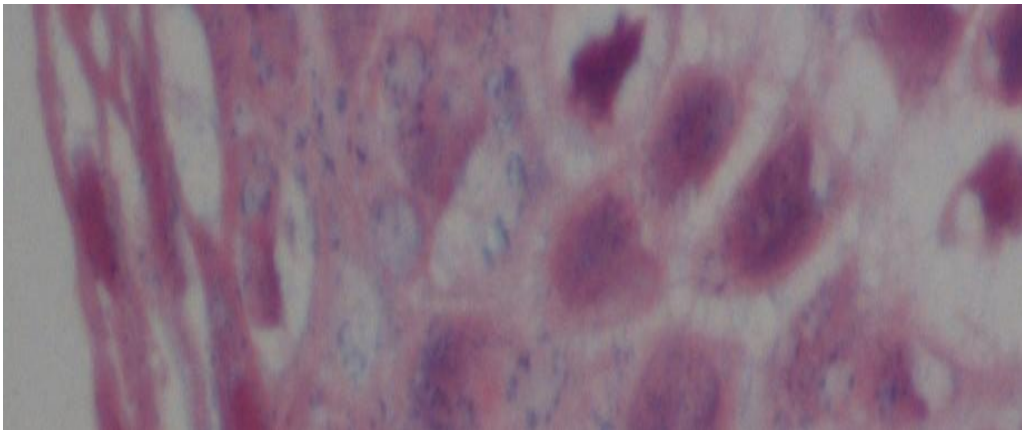


KUVIO 3. Viruskopiot eri dysplasiamuutoksissa (Ventana b).

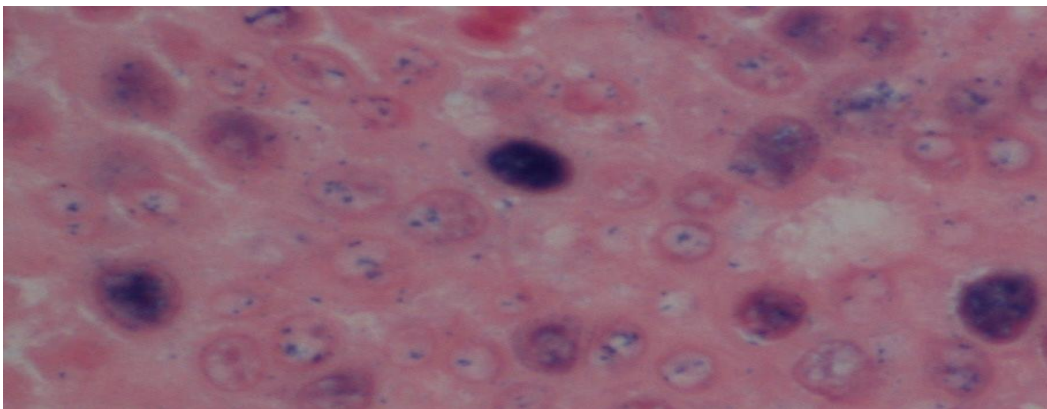
ISH:ta oli luonteva tulkita kahdella eri tavalla. Ensimmäiseksi näytteistä katsottiin ovatko ne positiivisia vai negatiivisia. Toiseksi katsottiin olivatko positiiviset näytteet värjäytyneet episomaalisesti vai integroidusti (Ks. kuvio 4-6 s. 26-27). Episomaalisia positiivisia HPV-soluja olivat sellaiset solut joiden tumat ovat värjäytyneet kokonaan eli tumassa on runsaasti viruskopioita. Tämä on tyypillistä lievissä dysplastisissa muutoksissa. Integroituja positiivisia HPV-soluja esiintyi vakavammissa dysplastisissa muutoksissa. Integroiduille soluille on tyypillistä, että tumassa on vain muutama HPV DNA:n viruskopio. Näiden välillä ei kuitenkaan ole selvää rajaa, joten tulkinta on haasteellista ja se täytyy tehdä huolellisesti.



KUVIO 4. Episomaalisesti värjäytyvät ISH-solut (10x).



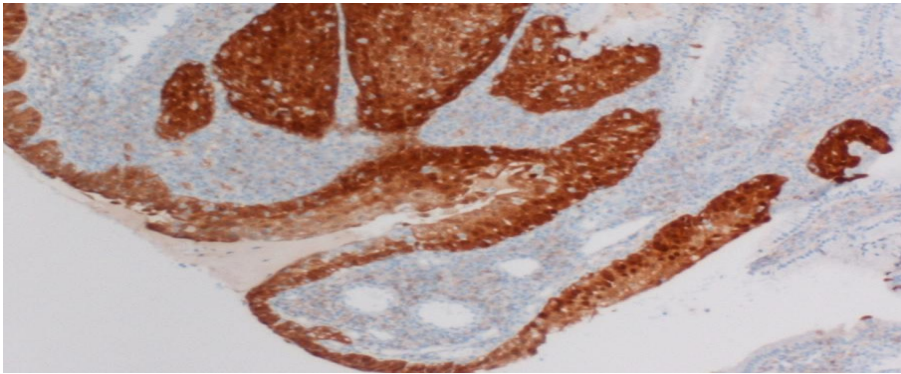
KUVIO 5. Integroidusti värjäytyvät ISH-solut (40x).



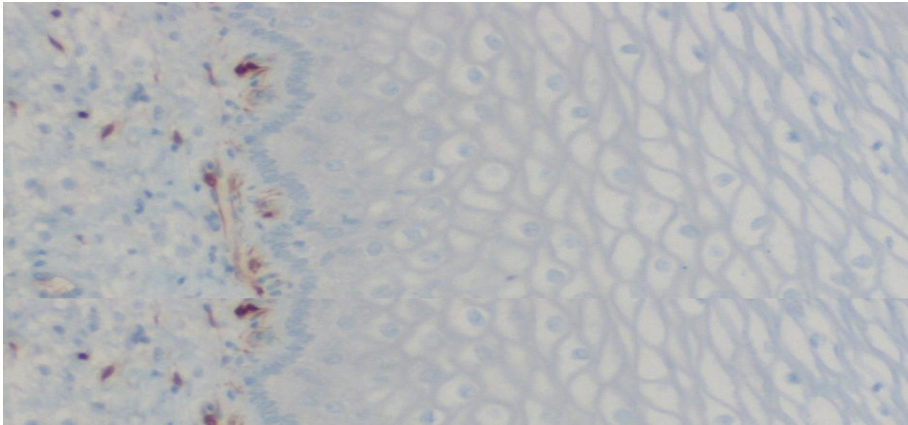
KUVIO 6. Kuvassa esiintyy sekä integroidusti että episomaalisesti värjäytyviä soluja (40x).

Immunohistologisilla menetelmillä tehty p16INK4a ja Ki67:n tulkintakriteerit olivat huomattavasti helpompia, koska molempien värjäyksen tulos tulkittiin positiiviseksi (+) tai negatiiviseksi (-). Immunohistokemiallisissa värjäyksissä kaave-näytteet olivat vaikeammin tulkittavissa, koska varsinaista pintaepiteelisolukkoa ei välttämättä ole tai se on pieninä irtonaisina kappaleina.

Positiivisissa p16INK4a-värjäyksessä solujen sytoplasmat värjäytyivät punaruskeiksi. Tässä kohtaa tuli katsoa myös mihin epiteelikerrokseen positiiviset p16INK4a-solut sijoittuivat. Se oli merkityksellistä arvioitaessa näytteen dysplastisia muutoksia (ks. kuvio 7 s. 28). Negatiivisiksi näytteiksi tulkittiin värjäykset, joissa muutama positiiviseksi värjäytynyt solu tai värjäytyneet solut ovat väärässä paikassa. (ks. kuvio 8 s. 28)

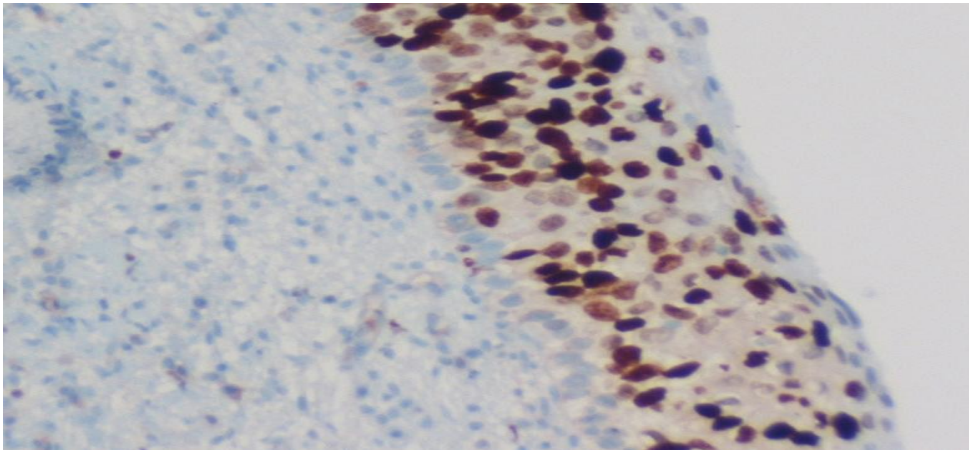


KUVIO 7. Positiivinen p16INK4a (10x)

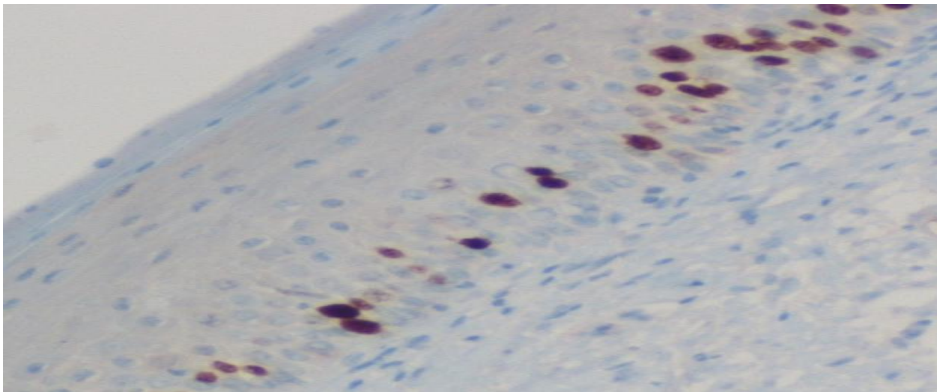


KUVIO 8. Negatiivinen p16INK4a (40x).

Ki67:ssä yksi värjäytynyt solu luettiin negatiiviseksi näytteeksi. Positiivisia soluja tuli olla runsaasti näytteessä, jotta tuloksen pystyi tulkitsemaan positiiviseksi (ks. kuvio 9-10 s. 29). Positiivisissa Ki67-näytteissä värjäytyivät vain epiteelisolujen tumat punaruskeiksi. Oli tärkeää seurata mihin solukerrokseen asti Ki67-positiivisia soluja ulottui. Ki67-solut jakautuvat basaalkerroksesta alkaen. Mitä enemmän epiteelin pinnassa niitä esiintyi suhteessa myös määrään, sitä vakavammasta dysplastisesta muutoksesta oli kyse.



KUVIO 9. Positiivinen Ki67 (40x)



KUVIO 10. Negatiiviseksi tulkittu Ki67 (40x), jossa positiivista värjäytymistä ilmenee vain basaalikerroksessa.

7.6 Tuloksien kirjaaminen

Aluksi oli 40 eri solublokkia joita tutkittiin (ks. taulukko 2 s. 30). Näistä kymmenen kondylooma planumia, kymmenen dysplasia levistä, kymmenen dysplasia moderataa ja kymmenen dysplasia gravista, jotka kuvasivat histologisia luokkia. Solublokeista saadut värjäystulokset kirjattiin samaan taulukkoon. Oikealle sarakkeelle laitettiin potilaasta tehty alkuperäinen diagnoosiluokka. Seuraavaan sarakkeeseen laitettiin diagnoosiluokka, joka saatiin samasta solublokista, mistä alkuperäisenkin diagnoosi oli tehty. Solublokista leikattiin näytteet ja ne värjättiin HE-värjäyksellä. Patologi diagnosoi nämä värjäykset uudelleen. HE-värjäys

tehtiin sen vuoksi, että ISH- p16INK4a- ja Ki67-värjäysien leikkeet olisivat peräkkäin leikkattu. Tällöin värjäykset olivat vertailukelpoisia ja diagnoosiluokka vastasi muiden värjäysten antamia tuloksia. Seuraaviin sarakkeisiin laitettiin ISH-, p16INK4a- ja Ki67-värjäyksien antamat vastaukset.

8 TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA

Taulukon pystyrivissä on jokainen potilastapaus ja vaakarivissä ensimmäisenä alkuperäinen HE-värjäyksestä saatu diagnoosi. Seuraavaksi ovat uudet HE-, ISH-, p16INK4a- sekä Ki67-värjäystulokset. Immunohistologisista värjäyksistä merkittiin, olivatko näytteet positiivisia vai negatiivisia. ISH-värjäyksistä merkittiin sen lisäksi oliko värjäys episomaalinen vai integroitunut.

TAULUKKO 2. Tulokset. DL = Dysplasia levis, DM = Dysplasia moderata DG=Dysplasia gravis

Tapaukset	Dg.luokka/He(Ennen)	Dg.luokka(jälkeen)	ISH	p16iNK4a	Ki67
1	kondyloma planum	kondyloma planum	neg	neg	neg
2	kondyloma planum	kondyloma planum	neg	neg	neg
3	kondylo. planum+DM	kondyl. planum+DM	intergroitu	pos	pos
4					
5	kondyl. planum+DL	kondyloma planum+DL	intergroitu	pos	pos
6	kondyloma planum	kondyloma planum+DL	intergroitu/episoma	pos	pos
7	kondyl. planum+DL	DL	integroituu	pos	pos
8	kondyloma planum	kondyloma planum+DL	integroituu/episoma.	pos	pos
9	kondyloma planum	kondyloma planum	neg	neg	neg
10	kondyl. planum+DM	kondyl. planum+DM	integroituu	pos	pos
11	DL	DL	episoma.	pos	pos
12	DL	DL	integroituu	pos	pos
13	DL	DL	neg	neg	neg
14	DL	DM	integroituu	pos	pos
15	DL	DL	integroituu	pos	pos
16	DL	DL	integroituu/episoma.	pos	pos
17	DL	DL	integroituu	pos	pos
18	DL	DL	integroituu	pos	pos
19	DL	DL	integroituu	pos	pos
20	DL	DL	episoma.	pos	pos
21	DM	DM	integroituu	pos	pos
22	DM	DG	integroituu	pos	pos
23	DM	DL	integroituu	pos	pos
24	DM	kondyloma planum			

25	DM	DM	integroitu	pos	pos
26	DM	DM	integroitu	pos	pos
27	DM	DM	integroitu/episoma.	pos	pos
28	DM	DL	integroitu/episoma.	pos	pos
29	DM	DG	Integroitu	pos	pos
30	DM	DM	integroitu/episoma.	pos	pos
31	DG	DG	integroitu	pos	pos
32	DG	DG	episoma.	pos	pos
33	DG	DG	integroitu	pos	pos
34	DG	DG	integroitu/episoma.	pos	pos
35	DG	DG	integroitu	pos	pos
36	DG	Ei dysplasiaa	neg	neg	neg
37	DG	DM	integroitu	pos	pos
38	DG	DG	episoma.	pos	pos
39	DG	DM	episoma.	pos	pos
40	DG	DG	integroitu	pos	pos

8.1 Dysplastisten luokitusten vertailu

Hematoksyliini-eosiinivärjättyjä laseja verrattiin alkuperäisiin HE-värjäyksiin, josta oli tehty diagnoosi. Patologi tarkisti molemmat näytelasit, jolloin selvisi, oliko alkuperäinen diagnoosi muuttunut vai pysynyt samana. Jos dysplastinen luokka oli muuttunut, se huomiointiin tuloksien tulkinnassa. Histologinen luokitus oli voinut muuttua, kun näytteitä leikattiin toistamiseen. Tämä tarkoittaa sitä, että kohta josta alkuperäinen luokitus on määritelty, oli muuttunut ja alkuperäiset dysplastiset muutokset olivat voineet leikkaantua pois. Näytettä leikattaessa syvemmälle oli uusia muutoksia voinut tulla esille. Näin oli tapahtunut muutamien näytteen kohdalla. On huomioitava myös eri patologioiden erilainen näkemys rajatapauksien tulkinnassa.

Suurimmassa osassa kondyloma planum -tapauksia luokitus pysyi samana. Neljässä kondyloma planum -näytteessä oli mukana myös muuta dysplastista luokitusta. Yksi näytteistä oli muuttunut kokonaan dysplasia levikseksi. Kahdesta näytteestä löytyi lisäksi dysplasia levisä, jota ei ollut alkuperäisessä näytteessä. Yksi näistä näytteistä (näyte 4) jouduttiin sulkemaan tulkinnoista pois kokonaan, koska se oli otettu väärästä kudoksesta.

Dysplasia levis -tapauksien kohdalla 90 % (9/10) tapauksista pysyi samana luokituksena. Eli ainoastaan yksi näyte muutti luokitustaan dysplasia leviksestä dysplasia moderataan.

Dysplasia moderata -tapauksien kohdalla oli muutoksia tapahtunut enemmän. Vain 50 % (5/10) tapauksista oli säilyttänyt saman luokituksen. Kaksi tapausta oli muuttunut vakavemmaksi eli dysplasia gravikseksi, kun taas kaksi oli saanut lievemmän dysplastisen luokituksen eli dysplasia leviksen. Yksi näytteistä sai uudeksi luokakseen kondyloma planumin. Syynä tähän voi olla se, että samaa tapausta on käytetty sekä kondyloma planumin, että dysplasia moderatan kohdalla, koska alkuperäisestä näytteestä oli löytynyt molempia. Dysplasia moderataa kuvastava kudiskohta oli luultavasti leikkaantunut jo pois. Samasta näytteestä ISH ja immunohistokemialliset värjäykset olivat epäonnistuneet leikkkeen huonon kunnan vuoksi.

Dysplasia graviksen kohdalla 70 % (7/10) näytteistä oli säilyttänyt saman luokituksen. Kahdessa tapauksessa diagnoosi oli muuttunut dysplasia moderataksi. Yhdestä näytteestä ei löytynyt dysplastista muutosta ollenkaan. Tämä johtuu luultavasti siitä, että yhdestä tapauksesta löytyi alun perin monta eri blokkia. Niistä on valittu blokki, jossa dysplasia gravista ei esiinny.

Työssä käsiteltyjen näytteiden muuttuneet diagnoosit eivät vaikuta potilaan hoitoon. Vaikutusta ei ole, koska näytteiden diagnoosiluokat, jotka ovat muuttuneet, ovat kuitenkin lähellä toisiaan. Esimerkiksi jos alkuperäinen diagnoosiluokka on ollut dysplasia levis ja uusi diagnoosiluokka, kondyloma planum, ei hoitomuoto ole muuttunut.

8.2 *In situ* -hybridisaation antamat tulokset

HPV *in situ* -hybridisaatiovärjäyksessä arviointikriteereitä oli kaksi. Ensimmäiseksi katsottiin, värjäytyikö näyte oikein ja oliko tulos positiivinen vai negatiivinen. Negatiivisen värjäys tuloksen antoi 12.5 % (5/40) näytteistä. Yhdessä näytteessä ei ollut dysplasiaa lainkaan. Myös kolme muuta näytettä, joista löytyi ainoastaan kondyloma planumia, antoi negatiivisen tuloksen. Yksi dysplasia levis -näyte antoi myös negatiivisen tuloksen.

Toiseksi katsottiin, ovatko solut värjäytyneet episomaalisesti vai integroidusti. Episomaalissa värjäyksessä koko tuma värjäytyy siniseksi, joka johtuu ihmisen papilloomaviruskopioiden suuresta määrästä. Integroituneessa värjäyksessä ihmisen papilloomaviruskopiot ovat havaittavissa pieninä pisteinä tumassa. Suurin osa näytteistä värjäytyi integroidusti.

Kuvion 3 (s. 25) mukaan integroitunutta värjäytymistä tulisi esiintyä vain vakavimmissa dysplastisissa muutoksissa. Koska samassa kudisleikkeessä on voinut olla kahta tai useampaa eri dysplastista luokkaa, voi melkein missä näytteessä tahansa esiintyä integroituneita solutyyppejä. Vain pieni osa, 12,5 % (5/40), kaikista näytteistä antoi episomaalisen värjäystuloksen. Nämä tapaukset eivät ryhmittyneet johonkin tiettyyn dysplastiseen luokkaan, vaan ne olivat hajallaan jokaisessa eri luokitusryhmässä. Tästä johtuen ei voida todeta episomaalisten solujen ilmenevän lievemmissä dysplastisissa luokissa. Molempia solumuutoksia löytyi 17,5 % (7/40) tapauksista.

Näytteistä 5 % (2/40) jouduttiin hylkäämään. Näyte 4 jouduttiin hylkäämään, koska se oli väärää kudosta. Näyte 24 oli tuhoutunut eli siitäkään ei saatu tulosta.

8.3 Muiden merkkiaineiden (p16INK4a ja Ki67) vastaavuus HPV *in situ*-hybridisaation antamiin tuloksiin

Suurin osa immunohistologisista värjäyksistä antoi positiivisen tuloksen. Värjäykset osoittivat merkkiaineiden p16INK4a- ja Ki67- proteiinien esiintymistä kudoksessa. Näytteistä arvioitiin vain se, olivatko ne positiivisia vai negatiivisia. Positiiviset HPV *in situ* -näytteet olivat myös immunohistokemiallisissa värjäyksissä positiivisia ja negatiiviset HPV *in situ* -näytteet negatiivisia. Positiiviset immunohistokemialliset värjäystulokset tukivat positiivisten HPV *in situ* -näytteiden luotettavuutta. Ihmisen papillomavirusinfektio saa aikaan näiden proteiinien vahvempaa ilmenemistä kudoksessa.

Tulosten tulkintaa häiritsi se, että negatiivisiksi tulkituissa näytteissä on voinut olla hieman positiivista taustavärjäytymistä. Näytteessä voi myös olla muutamia soluja sekä solusarekkeitä, jotka eivät ole selkeästi positiivisia. Ohjaava bioanalyttikko sekä patologi konsultoivat vaikeasti tulkittavat näytteet. Bioanalyttikko katsoi ja tulkitsi kaikki näytelasit. Patologi tarkisti kaikki epäselviksi osoittautuneet näytelasit. Tämän jälkeen tulokset koottiin yhteen ja niistä katsottiin värjäytyvyyden sekä tulkinnan ongelmakohdat.

p16INK4a:n antamista tuloksista 82,5 % (33/40) oli positiivisia. Kahta näytettä ei voitu tulkita ja viisi antoi negatiivisen tuloksen. Ki67:ssä oli myös 82,5 % (33/40) positiivista näytettä, kaksi ei tulkittavissa olevaa ja viisi negatiivista tulosta. p16INK4a:n antamat posi-

tiiviset ja negatiiviset tulokset olivat vastaavasti samoissa Ki67:n näytteissä samanlaiset. Näytteet, joita ei pystytty tulkitsemaan, olivat samat molemmissa värjäyksissä.

8.4 Kontrollien antamat tulokset

Värjäyksissä käytettiin kaupallisia sekä itsetehtyjä kontrolleja. Itsetehtyjen kontrollien kanssa tuli olla tarkkana, jotta näytteeksi saatiin joko tunnettua positiivista tai negatiivista kudosta. Kaikissa värjäyksissä (ISH, p16INK4a, Ki67 ja HE) toimivat sekä positiiviset että negatiiviset kontrollit odotetulla tavalla.

8.5 Tulosten yhteenveto

Saatujen tuloksien perusteella Kätilöopiston sairaalan laboratorio voi ottaa HPV *in situ*-hybridisaation käyttöönsä. Suurin osa värjäyksien tuloksista antoi positiivisen tuloksen. Myös kaikki diagnoosiluokat kondyloma planum, dysplasia levis, dysplasia moderata ja dysplasia gravis värjäytyivät positiivisesti, mikä kertoo värjäyksen toimivuudesta.

Tutkimuksen onnistumista tukee tutkimuksen luotettavuus. Luotettavuutta arvioitaessa oli otettava monta asiaa huomioon. Tuloksien luotettavuutta tukivat ensinnäkin positiiviset sekä negatiiviset kontrollit, jotka antoivat odotetut tulokset. Toinen luotettavuutta tukeva asia oli immunohistokemiallisten värjäyksien antamat tulokset. Merkkiaineiden tulokset (p16INK4a ja Ki67) olivat yhtenevät *in situ*-hybridisaation tuloksien kanssa. HPV ISH:n antaessa positiivisen tuloksen tuli positiivinen tulos myös immunohistokemiallisilla värjäyksillä. Sama toistui näytteen antaessa negatiivisen tuloksen. Kolmas luotettavuutta tukeva asia oli hematoksyliini-eosiinivärjäys. Sen avulla tarkistettiin diagnoosi samalta kudoksetilasta, josta muutkin värjäykset on tehty.

9 LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI

In situ-hybridisaation antamia tuloksia oli vaikea tulkita syvemmin ilman asiaan perehtyneen lääkärin apua. Ohjaava bioanalyytikko tarkisti vielä kaikki tulokset. Epäselvät tapaukset tarkisti patologi. On kuitenkin epävarmuustekijöitä, jotka täytyi ottaa luotettavuutta ar-

vioidessa huomioon. Näitä asioita on käsitelty seuraavissa kappaleissa.

Työn laadullisuus alkoi oikein valituista ja kerätyistä näytteistä. HUSLAB:n tietokannasta, Qpatista, valittiin tutkimukseen tulevat näytteet sytologisen luokituksen perusteella. Näistä selvitettiin vielä histologinen luokitus, jonka perusteella näytteet haettiin. Tässä osuudessa laadullisuus toimi hyvin. Näytteet kerättiin numeroiden perusteella arkistosta. Tässä vaiheessa ilmeni muutama virhe, koska joukkoon oli eksynyt yksi väärää kudosta oleva näyte. Sen lisäksi yhdestä näytteestä oli valittu väärä blokki, jossa oli normaalia kudosta. Nämä virhelähteet eivät vaikuttaneet laadullisuuteen, koska ilman näitä näytteitä meillä on kuitenkin luotettavan suuri otoskoko.

Näytteiden oikeaan värjäytyvyyteen vaikutti myös fiksaatio. Tähän ei voitu vaikuttaa, koska näytteet oli fiksoitu yleisesti käytetyssä fiksaatioaineessa, 10 % formaliinissa noin vuorokausi ja valettu paraffiniin.

Näytteiden täytyi olla oikeaoppisesti leikattuja. Leikepaksuutena käytettiin 4µm paksuista leikettä, mutta lopputulokseen saattoi vaikuttaa eri leikkajille ominainen käsiala. Myös blokkien lämpölaajeneminen leikatessa oli voinut vaikuttaa leikkeiden paksuuteen. Tällä ei kuitenkaan todettu olevan vaikutusta värjäytyvyyteen, koska suurin osa näytelaseistamme oli värjäytyvyydeltään hyviä. Jos jokainen olisi leikannut eripaksuisia näytteitä, olisi ohuimpia leikkeitä ollut vaikea tulkita mikroskooppisesti. Koska leikkaajilla oli vähän kokemusta leikkaamisesta, tuli leikkeihin jonkin verran pieniä ryppejä. Tämä saattoi olla merkityksellistä näytettä diagnosoitaessa. Värjäytyneet "täplät" olivat voineet jäädä rypyn alle, joten muutos olisi voinut jäädä huomaamatta. Myös p16INKI4a:ssa ja Ki67:ssä tärkeä kudiskohta on voinut jäädä rypyssä olevan kudoksen alle. Kudoksen ryppeytyminen olisi voinut tapahtua alkuvaiheessa eli leikattaessa näytettä, saatettaessa näyte lasille tai kuivattaessa sitä väärin. Näytteen ryppeisyyteen olisi voinut vaikuttaa myös vääränlainen lasi oikeanlaisen Superfrost-lasin sijaan.

Hematoksyliini-eosiinilasi värjättiin automaattilaitteella muiden potilasnäytteiden kanssa. Voitiin olettaa, että värjäys on luotettava, koska näytteet värjättiin Kätilöopiston sairaalan laboratorion omien ohjeiden ja säännösten mukaan. Mikroskooppisesti tarkasteltaessa muutamaa lasia, voitiin todeta värjäys onnistuneeksi. Patologi katsoi kaikki HE-lasit. Tästä päätellen värjäykset ovat onnistuneet hyvin, koska hän pystyi tekemään oman arvionsa jokai-

sesta näytteestä.

Immunohistokemialliset värjäykset tehtiin Benchmark-laitteella ohjeen mukaan. Immunohistokemiallisia näytteitä tehtäessä oli tärkeää valita oikeanlaista kudosta edustavat kontrollinäytteet. Oli otettava huomioon missä kaikissa kudospaloissa on normaalisti positiivisia Ki67- ja p16INK4a-soluja. Näin saatiin luotettavat negatiiviset kontrollit ja nähtiin, että värjäys on toiminut. Negatiivisina kontrolleina käytimme tunnettua negatiivista portiobiopsia näytettä. Luotettavuutta lisäsi vielä jokaisella lasilla mukana oleva positiivinen kontrolli, joka oli otettu tunnetusta positiivisesta portiobiopsia näytteestä.

p16ink4a-värjäystä tehtäessä koetin lisättiin lasille käsin pipettiä apuna käyttäen. Tässä tuli olla tarkkana. Jos pipettimen kärki olisi osunut näytteeseen tai koetin ei olisi kohdistunut näytteen ja öljyn väliin, ei koetin olisi päässyt leviämään tasaisesti kaikkialle näytettä. Tämä olisi vaikuttanut havaittujen värjäytyneiden solujen määrään. p16INK4a:ssa käytettiin uutta multimeerikittiä, joka on luotettavampi ja parempi kuin aikaisempi multimeeri- tai polymeerikitti.

In situ -hybridisaatiovärjäyksessä lisättiin luotettavuutta dekontaminaation avulla. Reagenssit vaihdettiin puhtaisiin ja säiliöt pestiin, jonka jälkeen analysaattori teki erilaisia testejä. Nousevan alkoholisarjan alkoholit ja ksyleenit vaihdettiin aina puhtaisiin jokaisen ajon näytteitä varten. Kaikilla näillä toimenpiteillä pyrittiin vähentämään *in situ* -hybridisaatiovärjäyksen taustavärjäytyvyyttä.

Tarkastelimme Bewetran, Shillerin ja Kongin tekemiä artikkeleita, joissa kaikissa oli tutkittu gynekologisesti merkittävää korkean riskin HPV:ta, mutta eri menetelmillä sekä eri näkökulmasta. Esiin nousi esimerkiksi Scillerin tutkimuksessa HC2-testin paremmuus, koska menetelmällä saadaan kvantitatiivinen tulos. CISH:ssa saatavaan tulokseen vaikuttavat tarkastelijan ammattitaito sekä kokemukseen perustuva taito lasien tarkastelussa. Schillerin ja Bewetran tutkimuksissa käytettiin nestemäistä gynekologista irtosolunäytettä, joten niiltä osin tutkimukset eivät ole vertailukelpoisia meidän työhömmme.

Luotettavuus oli tärkein päämäärä käyttöönoton onnistumisen kannalta. Monia eri näkökulmia yritettiin löytää selvitellessä aihetta. Kaikki virhelähteet, niin teoreettiset kuin käyt-

tännöllisetkin (tekijästä johtuvat) tuli ottaa huomioon. Luotettavuusnäkökulma oli lähtökohtana kaikille suorituksille kuten leikkaaminen, värjääminen ja niin edelleen.

10 POHDINTA

Päätavoitteemme oli tutkia, voidaanko HPV *in situ* -hybridisaatio ottaa käyttöön Kätilöopiston sairaalan patologian laboratoriossa. Teoriapuoli auttoi ymmärtämään viruksen käyttäytymistä soluissa ja kudoksissa sekä miten saatua tietoa voidaan käyttää hyväksi tutkittaessa ihmisen papilloomavirusta. On selvää, ettei mikään testi tai menetelmä yksinään johda diagnoosin tekemiseen, joten on hyvä olla erilaisia vaihtoehtoja, joilla voidaan lähestyä tutkittavaa asiaa. Teoriaosuudessa käsittelemmekin kaikki tutkimuksessamme käytetyt menetelmäperiaatteet.

Tutkimustulos oli toivottu. Sen perusteella HPV *in situ* -hybridisaatiomenetelmä on mahdollista ottaa käyttöön Kätilöopiston sairaalan patologian laboratoriossa. Tutkimustulokset olivat luotettavia, sillä immunohistokemialliset värjäykset tukivat ISH-menetelmää antamalla kustakin näytteestä samat positiiviset ja negatiiviset tulokset. Positiiviset ja negatiiviset kontrollit toimivat tärkeänä luotettavuuden kriteerinä odotetulla tavalla. Myös kaikki diagnoosiluokat kondyloma planum, dysplasia levis, dysplasia moderata ja dysplasia gravis värjäytyivät positiivisesti. Tämä kertoo siitä, että värjäys toimii. Tutkimuksessa käytetyt eri diagnoosiluokat eivät kuitenkaan vastaa kuviota 3. Saadut positiiviset värjästulokset kuitenkin riittivät antamaan tarpeeksi luotettavan kuvan HPV *in situ* -hybridisaation toimivuudesta.

Tutkimuksen tuloksilla patologi sai paljon hyödyllistä tietoa ihmisen papilloomaviruksen infektoimasta kudoksesta ja mahdollisista kudostuutoksista, koska näytteet ovat visuaalisessa muodossa. Hematoksyliini-eosiinivärjäyksellä tehtyjen näytteiden morfologia ilmentää HPV:n aiheuttamat muutokset. Muutokset johtuvat yleensä ihmisellä olevasta korkean riskin HPV:sta, mutta hematoksyliini-eosiinivärjäys ei kuitenkaan kerro viruksen määrästä tai muodosta.

Saimme myös hyödyllistä tietoa aikaisemmista tutkimuksista, siitä millaisia asioita kannat-

taa ottaa huomioon ennen HPV *in situ* -hybridisaatiomenetelmän käyttöönottoa. Nestemäisistä gynecologisista irtosolunäytteistä tehdyssä tutkimuksessa todettiin, että tuloksia tulkitessa täytyy olla asiaan hyvin perehtynyt patologi. Toisessa nestemäisistä gynecologisista irtosolunäytteistä tehdyssä tutkimuksessa tutkimustulosten perusteella todettiin, että näytteen diagnosoimista yksin HPV ISH:sta saatujen tuloksien perusteella ei kannattaisi tehdä, vaan diagnoosia tehdessä tulisi ottaa huomioon taudin kuvaan liittyvät muutkin tekijät ja testit. Biopsianäytteistä tehdyssä tutkimuksessa tutkijat pitivät p16INK4a:ta parempana menetelmänä, jos näytteessä on todettu olevan epämääräistä dysplasiaa.

Tulevaisuudessa Kätilöopiston sairaalan patologian laboratoriollla on paremmat mahdollisuudet tutkia ihmisen papilloomavirusta ja sen aiheuttamia muutoksia. Tämä on eduksi potilaalle, sillä mitä tarkemmin taudin etiologiaa tutkitaan, sitä helpompi on määrittää diagnoosi ja siitä seuraavat mahdolliset jatkotoimenpiteet. Tulevaisuudessa aiheesta voisi tutkia muunmuassa sitä, kuinka hyviä tuloksia saadaan nestemäisen gynecologisen irtosolunäytteen ollessa näytemateriaalina. ISH:ta, Ki67:a, p16INK4a:ta sekä muita HPV:ta tai syöpää kuvaavia markkereita käyttäen voisi tehdä ”paneelin”, joka näyttäisi kuinka moni eri menetelmä puoltaa HPV:n aiheuttavan syövän esiasteita.

LÄHTEET

- Aaltonen, Leena - Maija - Hiltunen-Back, Eija - Paavonen Jorma 2002:
Papilloomavirukset limakalvoilla. Verkkodokumentti.
<<http://www.helsinki.fi/~jpaavone/artik7g.pdf>> Luettu 11.4.2007.
- Auvinen, Eeva - Vaheri, Antti 2004: Papilloomavirukset. Terveysportti.
Verkkodokumentti. Päivitetty 2.1.2007
<http://www.terveysportti.fi/terveysportti/ekirjat_tmp.Naytaartikkeli?p_artikkeli=mbi00255#O2&kkel=mbi00255#O2> . Luettu 13.1.2007. (a)
- Auvinen, Eeva. Papilloomavirusinfektio.
<<http://www.hi.helsinki.fi/virus/papilloomaa2.html>>. Luettu 3.1.2007. (b)
- Bewtra, C - Xic, Q - Soundararajan, S - Catalica, Zoran - Hatcher, Lori 2005: Genital human papillomavirus testing by in situ hybridisation in liquid atypical cytologic material and follow-up biopsies. Acta cytological 49 (29). 127 - 131
- DacotaCytomation.(a) CINtec p16ink4a Cytology Kit. Scientific Background.
- DacotaCytomation.(b) CINtec p16ink4a Histology Kit.
- Digene Corporation. 2004: HC2 - käyttöohje. USA.
- Enotes. Encyclopedia of Cancer. Ki67. 2007. Verkkodokumentti. Päivitetty 9.1.2007.
<<http://health.enotes.com/cancer-encyclopedia/Ki67>>. Luettu 10.1.2007.
- Grogan, Thomas - Nitta, Hiro - Pestic - Dragovich, Lidia - Pang, Lizhen - Ji, Jay 2006: Interpretation Guide for Ventana INFORM® HPV Probes In Situ hybridization (ISH) Staining of Cervical Tissue. Ventana.
- Halkki, Liisa 2000: In situ -hybridisaatio. Kromosomien maailma. Helsingin yliopisto. Biotieteiden laitos. Verkkodokumentti. Päivitetty 2.2.2000.
<http://idisk.mac.com/liisa.halkka/Public/liisan.tyot/KrMaa99/KrMaaTUT/insituhybr.html>. Luettu 25.1.2007.
- Hirsjärvi, Sirkka - Remes, Pirkko - Sajavaara. Paula (1998) *Tutki ja kirjoita*. Helsinki. Tammi.
- Huovinen, Pentti - Meri, Seppo - Peltola, Heikki - Vaara, Martti - Vaheri, Antti - Valtonen, Ville 2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Jyväskylä. Gummerus.
- Ihalainen, Susanna 2006. Bioanalytiikka. HUSLAB, patologian osasto. Helsinki. haastateltu 23.11.2006.
- Jumppanen, Mervi 2007: In situ hybridisaatio -menetelmä patologian laboratorion työvälineenä. Labquality-päivät.

- Koivuniemi, Ari.1994: Kliininen sytologia. Helsinki: Kandidaattikustannus.
- Kong - Balzer - patterson - Longacre 2007:p16INK4a immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. Am J Surg Pathol 31 (1):33 - 43.
- Käypähoito 2006 (a): Kohdunkaulan, emättimen ja ulkosynnyntien solumuutokset – diagnostiikka, hoito ja seuranta, potilasversio. Päivitetty 23.8.2006. Verkkodokumentti.<http://www.kaypahoito.fi/kh/kaypahoito?suositus=kh_p00061#s2>. Luettu 5.3.2007.
- Käypähoito 2006 (b): Tuore Käypä hoito –suositus linjaa diagnostiikkaa ja hoitoa: Kohdunkaulan syöpää ehkäistään edelleen varmimmin papa-seulonalla. Päivitetty 26.8.2006. Verkkodokumentti. <http://www.kaypahoito.fi/kotisivut/sivut.nayta?p_sivu=40990>. Luettu 17.1.2007.
- Lehtinen, Matti - Apter, Den - Heikkilä, Riitta - Heino, Pirkko - Idänpään-Heikkilä, Ilo - Rinpilä, Kaisa - Malm, Christian - Zilliacus, Robert 2002: Rokote papilloomavirusinfektioita ja syöpäävastaan. Terveysportti. Verkkodokumentti. <http://www.terveysportti.fi/ltk/ltk.koti?p_haku=hpv> Luettu 11.4.2007.
- Molekyylysytologian työt 1997: In situ hybridisaatio. Verkkodokumentti. <http://www.helsinki.fi/~saura/insitu.html#YLEISTA>. Luettu 19.12.2006.
- Nieminen, Pekka: Papa-näyte ja Bethesda luokitus. Cancerregistry. <http://www.cancerregistry.fi/joukkotarkastus/2-10-11_37.ppt#283,1, Papa-näyte ja Bethesda-luokitus kohdunkaulan syöpää ehkäisevässä seulonnassa>.Luettu 16.1.2007.
- Ollikka, Pauli 2007: Esimerkkejä geenitekniikan käytöstä virusdiagnostiikassa. Verkkodokumentti. http://www.edu.fi/oph/abc/dna/vir_gt2.html. Luettu 19.12.2006.
- Polvi, Harri: Kondylooma eli visvasyyli. Päivitetty 14.8.2006. Verkkodokumentti. <<http://www.yths.fi/netcomm/viewarticle.asp?path=8,21,2476,2504&article1862&index=A&page=1&strSearchText=HPV&iSearchMode=2>>. Luettu 16.1.2007.
- Rantala, Immo - Lounatmaa, Kari 1998: biologinen valomikroskopia. Yliopistopaino.
- Rubin, Anita - Lehtinen, Miika 2005. Verkkodokumentti. Tieteellinen tieto ja tiedon intressit.<<http://www.tukkk.fi/tutu/topi/tekstit/tieteellinen%20tieto/tieteellinen%20tieto.htm>>. Luettu 19.1.2007.
- Shiller - Nickolow - Kaul - Hahn - Hy - Escobar - Wtkins - Sturgis 2004:High-risk human papillomavirus detection: a split-sample comparison of hybrid capture and homogenic in situ hybridization. Am J Clin Pathol 121 (4):537-45.

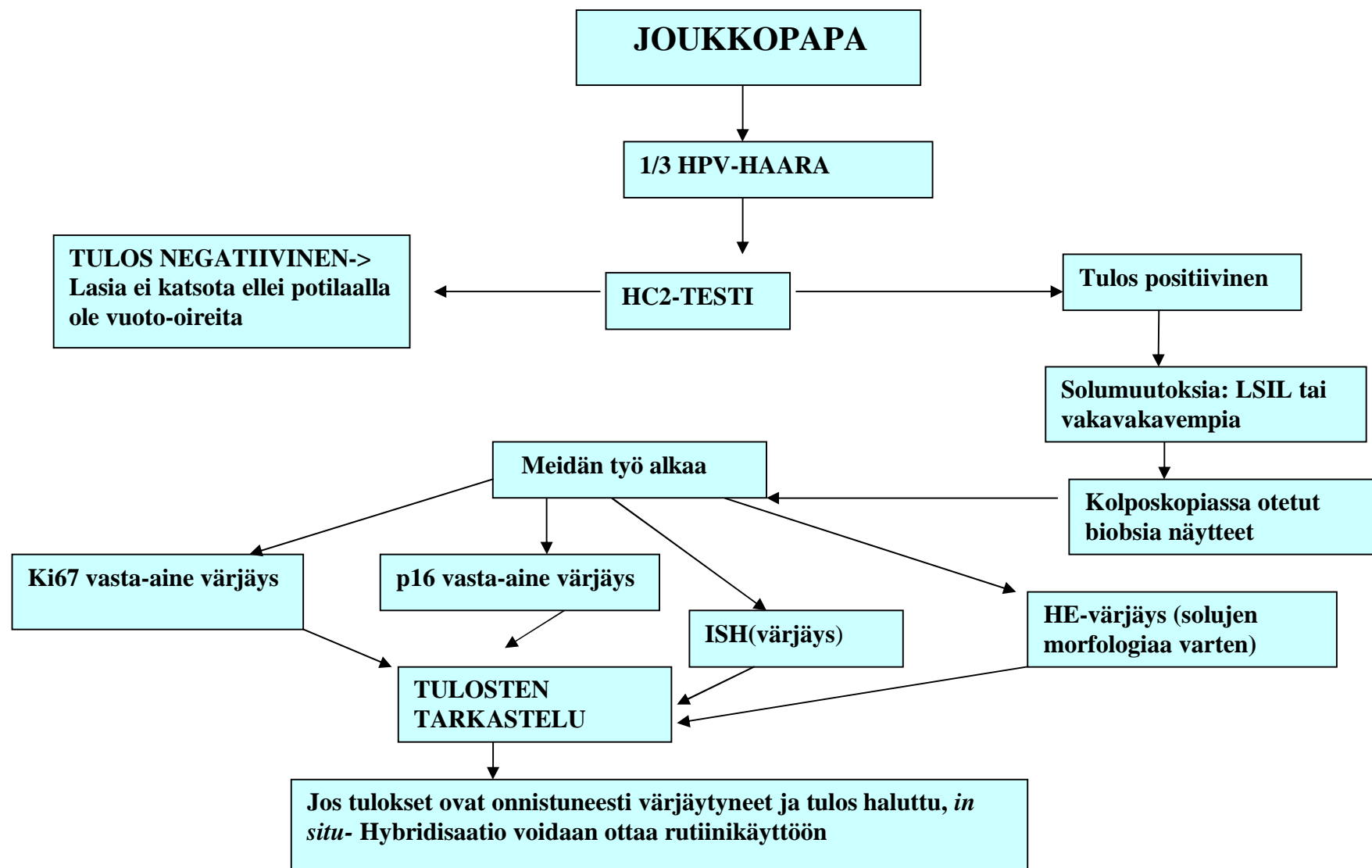
- Sironen, Reijo - Helminen, Heikki 2004: Anatomian luentomoniste. Histologia 2004. Kuopion yliopisto anatomian laitos. Verkkodokumentti. <<http://www.uku.fi/anatomia/opetus/HIS2004.pdf>> Luettu 10.1.2007.
- StainsFile 2005: H&E Hematoxylin and Eosin. Verkkodokumentti. <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/hematoksylin/h-and-e.htm>. Luettu 5.2.2007.
- Suominen, Ilari - Ollikka, Pauli 2004: Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Helsinki: Opetushallitus.
- Syöpäjärjestö. 2007: Kohdunkaulan syöpää ehkäisevä neuvonta. Päivitetty 2.1.2007 Verkkodokumentti.<<http://www.cancer.fi/syovanehkaisy/joukkotarkastukset/kohdunkaula/>>. Luettu 19.1.2007.
- Syöpäjärjestöt. 2007: Kohdunkaulan syöpä. päivitetty 2.1.2007. Verkkodokumentti. <<http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/syopataudit/kohdunkaula/>>. Luettu 19.1.2007.
- Turun yliopisto 2007: Ihmisen papilloomavirus ja kohdunkaulan syöpä. Päivitetty 22.2.2007. Verkkodokumentti.<<http://domino.utu.fi/tiedotus/tiedotukset.nsf/61345dc704eae28ac22568bd00428706/91a669505a8437dac225728a0044daaf?OpenDocument>> Luettu 5.3.2007.
- Ventana (g): Diagnostic Solutions. Ultra View Microsoft Power point-esitys
- Ventana 2007 (b): HPV III Tissue Nordic meeting, Microsoft Power Point-esitys.
- Ventana 2006 (c): Inform HPV III Family 16 Probe (B), reagenssiohje.
- Ventana 2007 (a): ISH general, Microsoft Power point-esitys.
- Ventana 2004 (d): ISH Protease 3, reagenssiohje
- Ventana 2005 (f): ISH iWIEW Blue Plus Detection Kit, reagenssiohje.
- Ventana (h): Ventana IHC & Products on BenchMark TM
- Ventana 2007 (e): Molecular Genetic English, Microsoft Power point-esitys.

HYBRIDCAPTURE 2- MENETELMÄN TYÖOHJE

1. Näyte on otettu sille tarkoitettuun putkeen harjalla.
2. Lisätään denaturointireagenssi (laimennettu natriumhydroksidiliuos, NaOH) 500µl, jolloin kaksijuosteinen DNA aukaistaan. Varo koskettamasta putken seinämiä.
3. Vortexoidaan nopeasti (noin 10 sekuntia). Putkissa näkyy violetti väri.
4. Inkuboidaan 65° 45 minuuttia, jotta kaikki juosteet erottuisivat toisistaan
5. Valmista koetinliuos noin kymmenen minuuttia ennen loppua lisätään korkean riskin HPV koetin, *probe*.
6. Vortexoidaan
7. Näytettä otetaan putkesta 75µl + 25µl koetinseosta Microplatelle (hybridisaatiokuoppalevy).
8. Näytteet laitetaan Rotary Shaker I:een, 1100rpm. (seoksen tulisi olla keltaisen värinen ja vaihtaa väriä vaaleanpunaiseksi)
9. Inkuboidaan 65° 60 minuuttia, jotta koetin kiinnittyisi yksijuosteisiin DNA-säikeisiin.
10. Näyteitä laitetaan kaivoihin noin 105µl per/ tapaus, jolloin DNA+koetin kiinnittyvät kaivon seinämässä olevaan vasta-aineeseen (sieppauskuoppalevy, joka on sivelty anti-RNA:DNA-hybridivasta-aineella).
11. Näytteet laitetaan Rotary Shakeriin 60 minuutiksi 1100rpm. Tämän jälkeen kaada ylimääräinen neste pois kupista.
12. Lisätään Detection reagenssi 1, jolloin näytteiden tulisi näkyä vaalean punaisena. Osoitin reagenssi sisältää alkaaliseen fosfataasiin konjukoituja RNA:DNA- hyridienvasta-aineita.
13. Inkuboidaat noin 30 minuuttia 20-25°
14. Pestään sitoutumattomat yhdisteet
15. Lisätään detection reagenssi 2 (osoitin reagenssi 2)
16. Inkuboidaan 15 minuuttia 20-25°. Tämä tulee tapahtua valolta suojattuna.
17. Luetaan tuloksen luminometrillä viimeistään 30 minuutin jälkeen.

HC2-käyttöohjeet, Digene Corporation, USA

(Digene Corporation 2004)



VENTANAN HUOLTO-OHJE BENCHMARKINLAITTEELLE

Desinfektio toiminto Ventanan Benchmark-laitteelle käyttäen Sanogenea

1. Ensimmäinen askel on dekontaminoida 20 litran astiat, jossa laimennetaan Reaction Buffer, SSC ja EZ Prep liuokset. Sinun tulee tyhjentää jokainen astia ja pestä ne läpikotaisin sodiumhypokloridilla (kloridi). Anna laitteen inkuboitua ainakin tunnin verran. Huuhtelee vesijohtovedellä ja suorita viimeinen huuhtelu tislattulla vedellä.

2. Ennen instrumenttien ja astioiden dekontaminaatiota seitsemän astiaa irroitetaan laitteesta, AFM-modulista ja suoritetaan seuraavat vaiheet.

3. VIESTI: LCS-astiaa ei saa ikinä täyttää millään vesipitoisella liuoksella yhdistäessäsi astian laitteeseen. LCS-astia huuhdellaan 100%:lla alkoholilla ja annetaan sen kuivua.

4. Laitteen NexES Software- valikosta valitaan "TESTS" menu:

- Klikkaa "Function Tests"
- Valitse rivi "Tests - Ready to Ship" (kenttä muuttuu siniseksi valittuasi sen)
- Klikkaa "Run"-painiketta
- Odota 5 minuuttia ja pysäytä testi (Jos viestejä ei ilmesty, testi on valmis)

Toista tämä testi kaksi kertaa.

5. Tyhjennä astiat, pese ne ja huuhtelee useaan kertaan kuumalla vesijohtovedellä. Huom! LCS-astian annetaan olla paikoillaan.

Valmista Sanogene-desinfektio-/puhdistusliuos seuraavan ohjeen mukaisesti ja täytä astiat sillä:

Sanogene-tuote koostuu kahdesta osasta.

Toinen näistä sisältää Sanogenen ja toinen aktivaattorin.

Sekoita Sanogene ja Aktivaattori , odota viisi minuuttia, jonka jälkeen laimenna välittömästi 2,5 litraan tislattuun veteen (työliuosta = 200ppm TACD).

6. Aseta astiat takaisin laitteeseen, AFM-moduliin ja yhdistä.

7. Valitse koneen NexES Software-valikosta "TESTS"-menu:

- Klikkaa "Function Tests"

- Valitse rivi "Test - Prime +" (kenttä muuttuu siniseksi valittuasi sen)

- Klikkaa "Run"-painiketta

8. Kun viesti "Priming completed succesfully" ilmestyy näkyviin ruudulle, jätä liuos inkuboitumaan laitteeseen 15 minuutiksi.

9. Toista vaiheet 7 ja 8 uudelleen.

10. Irroita seitsemän astiaa AFM-modulista uudelleen.

11. Valitse NexES Software-valikosta "TESTS"-menu

- Klikkaa "Funktion Tests"

- Valitse rivi "Tests - Ready to Ship" (kenttä muuttuu siniseksi valittuasi sen)

- Klikkaa "Run"-painiketta

- Odota 5 minuuttia ja pysäytä testi (Jos viestejä ei ilmesty, testi on valmis)

Toista testi kaksi kertaa.

12. Tyhjennä astiat. Huuhtele ne useaan kertaan vesijohtovedellä ja suorita viimeinen huuhtelu tislatulla vedellä.

13. Täytä astiat tislatulla vedellä.

14. Aseta astiat takaisin laitteen AFM-moduliin ja yhdistä laitteeseen.

15. Valitse koneen NexES Software-valikosta "TESTS"-menu:

-Klikkaa "Function Tests"

-Valitse rivi "Test - Prime +" (kenttä muuttuu siniseksi valittuasi sen)

-Klikkaa "Run"-painiketta

Suorita tämä vaihe viisi kertaa.

16. Irroita seitsemän astiaa AFM-modulista.

17. Tyhjennä astiat ja huuhtelee ne kerran alkoholilla ja anna kuivua.

18. Täytä kaikki astiat uudelleen asiaankuuluvilla reagensseilla. (Älä unohda täyttää LCS-astiaa LSC:llä.)

19. Valitse koneen NexES Software-valikosta "TESTS"-menu:

-Klikkaa "Function Tests"

-Valitse rivi "Test - Prime +" (kenttä muuttuu siniseksi valittuasi sen)

-Klikkaa "Run"-painiketta

Suorita tämä vaihe viisi kertaa.

20. Laite on nyt valmis käyttöön, voit palata normaaliin toimintaan.

(Ventanan huolto-ohje Benchmarkin laitteella)

HPV ISH MENETELMÄ OHJE

1. Leikkaa 4µm paksuiset näytteet SuperFrost® -adhesiivi lasille ja mukaan positiivinen kontrolli. Valutetaan kuivaksi ja lämpökaappiin +60° C:een tunniksi.

2. Tee viivakooditarrat

Tee BenchMarkilla viivakooditarrat, joissa potilaan nimi ja näytenumero ja haluttu värjäys. Viivakoodin avulla laite tunnistaa halutun värjäyksen.

3. Lataa lasit ja käynnistä värjäysohjelma

Tarkistetaan että liuossykissä liuoksia tarpeeksi ja jätettä tyhjä. Avaa värjäysyksikön kansi ja laita kukin lasi omalle puhtaalle paikalle (konetta voidaan käyttää niin kauan pesemättä kun on puhtaita paikkoja). Laita reagenssikaruselliin huoneenlämmössä ollut ISH Red Counterstain. Sulje kansi ja laita reagenssikaruselli paikoilleen. Laita käyntiin tietokonenäytön ”Run” painikkeesta ja ruksaa ohjelman kysymät reagenssi tarkastuksien kohdat. Kerro laitteelle lasien määrä ja paina ”Start”.

4. Poista värjäytyneet lasit

Laite ilmoittaa äänimerkillä kun värjäys valmis. Lataa lasit yksitellen värjäyskelkkaan ja kelkka värjäysastiaan jossa muutama tippa tisko- astianpesuainetta ja vettä. Pese lasia noin 30 sekuntia ja huuhtelee juoksevan veden alla noin minuutti. Kun kaikki lämpölevyt on käytetty, paina tietokoneruudulta ”Clean”.

5. Peittele lasit

Vie lasit käsivärjäyspöydän nousevan alkoholisaarjan kautta ksyleeniin ja peittele peitinkalvoautomaatilla lyhyttä kalvoa käyttäen.

6. Tarkista värjäystulos ja vie lasit lääkärille.

Mikroskopoi leikkeet ja tarkista, että kontrollit värjäytyneet oikeasta kohdasta oikealla tavalla. Vedä mustalla tussilla viiva kontrollin ja varsinaisen leikkeen väliin selvyyden vuoksi ja vie lasit värjäystä pyytäneelle patologille.

(HPV ISH Kätilöopiston sairaalan patologian osaston p16 menetelmäohjetta mukaellen)

p16INK4a MENETELMÄN TYÖOHJE

1. Leikkaa 4µm paksuiset näytteet SuperFrost® -adhesiivi lasille ja mukaan positiivinen kontrolli. Valutetaan kuivaksi ja lämpökaappiin +60° C:een tunniksi.

2. Tee viivakooditarrat

Tee BenchMarkilla viivakooditarrat, joissa potilaan nimi ja näytenumero ja haluttu värjäys. Viivakoodin avulla laite tunnistaa halutun värjäyksen.

3. Lataa lasit ja käynnistä värjäysohjelma

Tarkistetaan että liuossykissä liuoksia tarpeeksi ja jätettä tyhjä. Avaa värjäyssykön kansi ja laita kukin lasi omalle puhtaalle paikalle (konetta voidaan käyttää niin kauan pesemättä kun on puhtaita paikkoja). Sulje kansi ja laiteta reagenssikaruselli paikoilleen.

Laita käyntiin tietokonenäytön ”Run” painikkeesta ja ruksaa ohjelman kysymät reagenssi tarkastuksien kohdat. Kerro laitteelle lasien määrä ja paina ”Start”.

4. Laimenna p16ink4a-vasta-aine

Laimenna p16ink4a-vasta-aine 1,5 eppendorf-putkeen, tarvittava määrä 1:50:een. Yhdelle lasille 100µl. Vasta-aine löytyy reagenssihuoneen jääkaapista. Täyteen ajoon mahtuu 20 lasia, jolloin vasta-ainetta tarvitaan 42 µl ja antibody diluent tarvitaan 2058 µl.

5. Pipetoi vasta-aine lasille

Kun laite on tarkistanut, että sillä on tarvittavat reagenssit lasien värjäämiseen, kiinnittänyt leikkeet lasille ja poistanut parafiinin, sekä esikäsitellyt leikkeet, jotta antigeenit paljastuvat, lasille voidaan pipetoida p16ink4a-vasta-aine.

Laite ilmoittaa äänimerkillä kun vasta-aine täytyy lisätä. Huomioitavaa, että pipetin kärki menee lasia peittävän öljykerroksen läpi.

6. Poista värjäytyneet lasit

Laite ilmoittaa äänimerkillä kun värjäys valmis. Lataa lasit yksitellen värjäyskelkkaan ja kelkka värjäysastiaan jossa muutama tippa tisko- astianpesuainetta ja vettä. Pese laseja noin 30 sekuntia ja huuhtelee juoksevan veden alla noin minuutti. Kun kaikki lämpölevyt on käytetty, paina tietokoneruudulta ”Clean”.

7. Peittele lasit

Vie lasit käsivärjäyspöydän nousevan alkoholisaarjan kautta ksyleeniin ja peittele peitinkalvoautomaatilla lyhyttä kalvoa käyttäen.

8. Tarkista värjäystulos ja vie lasit lääkärille.

Mikroskopoi leikkeet ja tarkista, että kontrollit värjäytyneet oikeasta kohdasta oikealla tavalla. Vedä mustalla tussilla viiva kontrollin ja varsinaisen leikkeen väliin selvyiden vuoksi ja vie lasit värjäystä pyytäneelle patologille.

(p16 INK2a Kättilöopiston sairaalan patologian osaston menetelmäohje)

Ki67 MENETELMÄN TYÖOHJE

1. Leikkaa 4µm paksuiset näytteet SuperFrost® -adhesiivi lasille ja mukaan positiivinen kontrolli. Valutetaan kuivaksi ja lämpökaappiin +60° C:een tunniksi.

2. Tee viivakooditarrat

Tee BenchMarkilla viivakooditarrat, joissa potilaan nimi ja näytenumero ja haluttu värjäys. Viivakoodin avulla laite tunnistaa halutun värjäyksen.

3. Lataa lasit ja käynnistä värjäysohjelma

Tarkistetaan että liuossykissä liuoksia tarpeeksi ja jätastia tyhjä. Avaa värjäysyksikön kansi ja laita kukin lasi omalle puhtaalle paikalle (konetta voidaan käyttää niin kauan pesemättä kun on puhtaita paikkoja). Laita reagenssikäruuseliin Ki67 primäärivasta-aine. Sulje kansi ja laita reagenssikäruuseli paikoilleen. Laita käyntiin tietokonenäytön ”Run” painikkeesta ja ruksaa ohjelman kysymät reagenssi tarkastuksien kohdat. Kerro laitteelle lasien määrä ja paina ”Start”.

4. Poista värjäytyneet lasit

Laite ilmoittaa äänimerkillä kun värjäys valmis. Lataa lasit yksitellen värjäyskelkkaan ja kelkka värjäysastiaan jossa muutama tippa tisko- astianpesuainetta ja vettä. Pese lasia noin 30 sekuntia ja huuhtelee juoksevan veden alla noin minuutti. Kun kaikki lämpölevyt on käytetty, paina tietokoneruudulta ”Clean”.

5. Peittele lasit

Vie lasit käsivärjäyspöydän nousevan alkoholisaarjan kautta ksyleeniin ja peittele peitinkalvoautomaatilla lyhyttä kalvoa käyttäen.

6. Tarkista värjäystulos ja vie lasit lääkärille.

Mikroskopoi leikkeet ja tarkista, että kontrollit värjäytyneet oikeasta kohdasta oikealla tavalla. Vedä mustalla tussilla viiva kontrollin ja varsinaisen leikkeen väliin selvyyden vuoksi ja vie lasit värjäystä pyytäneelle patologille.

(KI67 Kätilöopiston sairaalan patologian osaston p16 menetelmäohjetta mukaellen)

HE-VÄRJÄYS (KONEELLA)

Värjäys

1. Ksyleeni	3 min
2. Ksyleeni	3 min
3. Ksyleeni	3 min
4. Abs. alkoholi	1 min
5. Abs. alkoholi	2 min
6. 96 % alkoholi	1 min
7. weigertin HMTX	8 min
8. Kraanavesihuuhtelu	4 min
9. 1 % HCL-diffi	5 sek
10. Kraanavesi huuhtelu	5 min
11. Eosiini	3 min
12. Abs. alkoholi	1 min
13. Abs. alkoholi	1 min
14. Ksyleeni	2 min
15. Ksyleeni	3 min

Värjäystulos

Tumat värjäytyvät sinisenmustiksi, kalkki violetiksi, limat vaaleansinisiksi ja kollageenisäikeet kalpean vaaleanpunaisiksi. Fibriini värjäytyy syvän vaaleanpunaiseksi, sytoplasmat vaaleanpunaisen eri sävyillä, lihas syvän vaaleanpunaiseksi ja erytrosyytit ja eosinofiilit punaisiksi.

(Kätilöopiston sairaalan patologian laboratorion työohje)